

INAUGURAL - DISSERTATION

Zur
Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom Biologe Gerhard Rank
aus Konstanz

Tag der mündlichen Prüfung:

**Untersuchung epigenetischer Eigenschaften des
chromosomalen Elements *Fab7* und der beteiligten
Mechanismen in *Drosophila melanogaster***

Gutachter: Prof. Dr. Renato Paro
Priv. Doz. Dr. Dirk-Henner Lankenau

Die vorliegende Arbeit wurde am Zentrum für Molekulare Biologie in Heidelberg (ZMBH) erstellt. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Renato Paro für die Überlassung des Arbeitsplatzes in seiner Gruppe, sowie für die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. Dirk Henner Lankenau danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Giacomo Cavalli möchte ich danken für seine Hilfestellung bei meinen ersten „epigenetischen Schritten“, Matthias Prestel für den Austausch wertvoller Informationen, Marc Hild und Stefan Schönfelder für das sorgfältige Gegenlesen dieser Arbeit. Alexander Löwer und Marc Hild danke ich für hilfreiche Tipps bei der Datenverarbeitung. Meinem „Bench-Nachbar“ Stefan Schönfelder alias „Walter Plöck“ sei für seine stete Hilfsbereitschaft und den gemeinsamen Spaß an „unserer“ Bench gedankt. A big cheers to Michael „Lee Crosswind“ Stitzel for teaching useful American idioms and for being a great friend.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei hier gedankt für die gute Zusammenarbeit und der Schaffung eines tollen Arbeitsklimas.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinen Eltern, die mich all die Jahre unterstützt und im Geiste mitgetragen haben.

Nichts in der Geschichte des Lebens ist beständiger als der Wandel.

(Charles Darwin)

Zusammenfassung

In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* sind zwei Gruppen von Genen identifiziert worden, die das segmentspezifische und differentielle Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Regulationsfaktoren aufrechterhalten. Die Genprodukte der trithorax-Gruppe (trxG) wirken als positive Regulatoren und erhalten die Expression der Zielgene, während die Produkte der Polycomb-Gruppe (PcG) als negative Regulatoren dienen und reprimierende Funktionen ausüben. Die Produkte beider Genklassen wirken als Gedächtnisträger und „frieren“ den Expressionszustand ihrer Zielgene in bestimmten Chromatinstrukturen ein, indem sie an sogenannte „Cellular Memory Modules“ (CMMs) binden. Diese *cis*-regulatorischen DNA Elemente sind am Umschaltungsprozess der Zielgene vom reprimierten in den aktivierten Expressionszustand maßgeblich beteiligt.

Um Hinweise auf die Vorgänge während der Umschaltung des CMM zu erhalten, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob an diesem Prozess Transkription durch das CMM selbst beteiligt ist. Hierfür nutzte man transgene Fliegen, deren transgenes *Fab7* ein CMM aus dem Bithorax-Komplex, anhand des dualen Gal4 Systems vom reprimierten Grundzustand in den aktivierten Zustand umgeschaltet werden kann. Der jeweilige Zustand war anhand der *lacZ* und mini-*white* Reportergene abzulesen. In transgenen *Fab7* Linien wurde durch *in situ* Hybridisierungen gezeigt, dass das *Fab7* Element im Zuge seiner Aktivierung tatsächlich transkribiert wird. RT-PCRs zeigten, dass diese *Fab7* Transkripte während der gesamten *Drosophila*-Entwicklung nachzuweisen sind. Die Transkription wurde mittels Slot Blot bestätigt und zeigt, dass das *Fab7* CMM in proximal-distaler Orientierung transkribiert wurde. Um die Zellgedächtnis-vermittelnden Abschnitte des *Fab7* Elements zu bestimmen, wurden transgene Fliegen mit gekürzten *Fab7* Konstrukten hergestellt. Diese waren zwar in der Lage den reprimierten Zustand zu bewahren, konnten jedoch nicht in den aktivierten umgeschaltet werden. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass der proximale Abschnitt von *Fab7* einen kryptischen Promotor besitzt, da diese Linien keine Transkription durch die gekürzten Elemente zeigten.

Auch in der Wt Situation wurde Transkription des endogenen *Fab7* Elements durch *in situ* Hybridisierungen an Embryonen gefunden. Das endogene *Fab7* Element wird dabei segmentspezifisch transkribiert, überraschenderweise sogar in beiden Orientierungen. Weitere *cis*-regulatorische Sequenzen des BX-C zeigten ebenfalls segmentspezifische Expression und spiegelten das Kolinearitätsprinzip der von ihnen regulierten homöotischen Gene wider. Die Regulation und Expression der homöotischen Gene des BX-C scheint somit durch die Transkription *cis*-regulatorischer Abschnitte maßgeblich mitbestimmt zu werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1	Einleitung.....	1
1.1	Entwicklungsgenetik von <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.1.1	Die Regulationskaskade der embryonalen Entwicklungsgene.....	1
1.1.2	Der Bithorax-Komplex	2
1.1.3	Die Aufrechterhaltung determinierter Expressionsmuster.....	4
1.1.3.1	Die trithorax-Gruppe	5
1.1.3.2	Der SWI/SNF-Komplex.....	6
1.1.3.3	Die Polycomb-Gruppe	7
1.1.3.4	Epigenetik und der Histon-Code	9
1.2	Parallelen zu anderen <i>cis</i> -regulatorischen Systemen.....	11
1.2.1	Die Hox Gene	12
1.2.2	Der β -Globin Lokus.....	13
1.3	Das Zellgedächtnis	13
1.3.1	Polycomb Response Elemente (PREs) als chromosomale Gedächtnisträger	13
1.3.2	Epigenetische Markierung eines aktivierten CMMs	16
1.4	Ziele der Arbeit.....	17
2	Ergebnisse.....	19
2.1	<i>In situ</i> Hybridisierungen des <i>Fab7</i> Elements und <i>cis</i> -regulatorischer Sequenzen des BX-C.....	19
2.1.1	Das transgene <i>Fab7</i> CMM wird bei seiner Aktivierung transkribiert.....	19
2.1.2	Das endogene <i>Fab7</i> Element wird im Embryonalstadium segmentspezifisch transkribiert	20
2.1.3	<i>Cis</i> -regulatorische Sequenzen des BX-C werden kolinear exprimiert	23
2.2	<i>Fab7</i> RNA Interference (RNAi) verursacht einen Kutikula Phänotyp	25
2.3	Transkription des <i>Fab7</i> Elements während der Entwicklung	29
2.3.1	RT-PCR Analyse von <i>Fab7</i> RNAs des Embryonalstadiums	29
2.3.2	RT-PCR von larvaler <i>Fab7</i> RNA	32
2.3.3	RT-PCR von <i>Fab7</i> RNA adulter <i>Drosophila</i>	33

2.3.4	RNA Analyse embryonaler <i>Fab7</i> Transkripte	36
2.4	Charakterisierung des <i>Fab7</i> Elements anhand des dualen Gal4 Systems.....	37
2.4.1	Transgenkonstrukte.....	37
2.4.2	Transgene Fliegenlinien	38
2.4.3	Gal4 vermittelte Aktivierung der <i>Fab7</i> Transgene	41
2.4.3.1	<i>lacZ</i> Färbung von Embryonen und larvalen Speicheldrüsen	41
2.4.3.2	mini- <i>white</i> Expression der <i>Fab7</i> Transgenkonstrukte	43
2.4.3.3	Gekürzte transgene <i>Fab7</i> Konstrukte werden nicht transkribiert	45
3	Diskussion	47
3.1	Das exogene <i>Fab7</i> CMM wird bei seiner Aktivierung transkribiert.....	47
3.2	Gekürzte <i>Fab7</i> Fragmente reprimieren benachbarte Reportergene in transgenen Fliegen	50
3.3	Der proximale Abschnitt von <i>Fab7</i> wird für das Umschalten des CMMs benötigt	50
3.4	Das endogene <i>Fab7</i> Element des BX-C wird segmentspezifisch und bidirektional transkribiert	52
3.5	<i>Cis</i> -regulatorische Sequenzen werden kolinear exprimiert	53
3.6	<i>Fab7</i> RNAi ruft homöotische Transformationen hervor	55
3.6.1	<i>Abd-B</i> Regulation ist unabhängig von <i>Fab7</i> RNA	56
3.7	Zusammenfassung und Modell	57
3.8	Ausblick	61
4	Material	63
4.1	Plasmide	63
4.2	Bakterienstämme	65
4.3	<i>Drosophila melanogaster</i> Fliegenstämme	65
4.4	Primer.....	70
4.5	Antikörper	73
4.6	Chemikalien	73
4.7	Zutaten für Fliegenfutter	74
4.8	Sonstige Geräte und Materialien	74

5	Methoden	76
5.1	Elektroporation	76
5.2	P-Element vermittelte Keimbahntransformation.....	76
5.2.1	Fliegenzucht und Haltung	76
5.2.2	P-Element-vermittelte Transformation von <i>Drosophila</i> -Embryonen.....	77
5.2.3	Etablierung transformierter homozygoter <i>Drosophila</i> -Linien	81
5.3	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	81
5.3.1	PCR.....	81
5.3.2	RT-PCR.....	82
5.4	Nachweis der β -Galactosidase Aktivität in Embryonen	83
5.5	RNA Interference (RNAi).....	84
5.5.1	<i>In vitro</i> Transkription und Herstellung von dsRNA.....	84
5.5.2	RNAi in <i>Drosophila</i> Embryonen.....	84
5.5.3	Kutikula Analyse der dsRNA injizierten Embryonen	85
5.6	<i>In situ</i> Hybridisierung zur Lokalisierung spezifischer RNAs in <i>Drosophila</i> Embryonen	85
5.7	Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren aus <i>Drosophila melanogaster</i>	87
5.7.1	Isolierung von genomischer DNA	87
5.7.2	Isolierung von RNA.....	88
5.8	Primer Extension	88
5.9	Blot Analyse von Nukleinsäuren.....	90
5.9.1	Southern Blot.....	90
5.9.2	Nothern Blot.....	91
5.9.3	Slot Blot	92
6	Literatur	94
	Abkürzungen	104

1 Einleitung

1.1 Entwicklungsgenetik von *Drosophila melanogaster*

Die Entwicklung vom befruchteten Ei zu einer adulten *Drosophila* Fliege erfolgt nach einem strengen Bauplan, dessen Verwirklichung anfangs durch Komponenten des Muttertiers festgelegt wird. Schon in den frühen Entwicklungsstufen des *Drosophila* Embryos werden die grundlegenden Mechanismen zur Zelldifferenzierung aktiviert. So wird die spezifische Determinierung embryonaler Segmentierung bereits sehr früh angelegt, ist aber morphologisch nicht notwendigerweise sichtbar. Die Embryogenese wird in dieser Phase vorwiegend durch die zeitliche und räumliche Verteilung von Morphogenen gesteuert. Aus dem Zusammenspiel der Morphogengradienten entsteht der Bauplan für den wachsenden Organismus. Dabei ist die genaue Determination einer jeden Zelle von großer Bedeutung, denn die Nachkommen dieser Zellen müssen denselben Differenzierungsprozess viele Male durchlaufen. Während der Differenzierung müssen daher festgelegte Informationen und Programme zur Spezifizierung einer Zelle, bzw. eines Gewebes exakt an die Tochterzelle weitergegeben werden. Die Vererbung dieses determinierten Zustandes an die Tochterzelle wird als „Zellgedächtnis“ bezeichnet.

1.1.1 Die Regulationskaskade der embryonalen Entwicklungsgene

Die Entwicklung der *Drosophila* Fliege aus einer Eizelle beginnt mit der Verschmelzung der Keimzellen. In der Zygote ist jedoch schon ein erster Bauplan durch die Verteilung maternal bereitgestellter Morphogene vorgegeben. Sie bestimmen die anterior-posteriore, sowie die ventral-dorsale Polarität des Embryos. Die dafür verantwortlichen vier Klassen von maternalen Effektorgen sind identifiziert (Nüsslein-Vollhard et al., 1987) und kodieren vorwiegend Proteine zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Diese bewirken eine spezifische Expression zygotischer Gene innerhalb definierter Domänen des Embryos.

Von den maternalen Genen reguliert, kommen in den anschließenden Musterbildungsprozessen der Embryogenese die Segmentierungsgene zum Einsatz. Für die Anlegung der anterior-posterioren Achse des Embryos sind drei Gruppen von zygotischen Segmentierungsgenen verantwortlich. Ihre Expressionsmuster sind durch die maternal bereitgestellten Morphogengradienten festgelegt. An erster Stelle werden die Transkriptionsfaktoren kodier-

renden Lücken-Gene aktiviert. Sie sind in breiten Bereichen entlang der anterior-posterioren Achse verteilt und überlappen untereinander. Die Produkte der Lücken-Gene aktivieren im nächsten Schritt die Expression der Paar-Regel-Gene. Ihre Verteilungsmuster sind durch jeweils sieben Streifen charakterisiert, die sich später in alternierenden Segmenten widerspiegeln. Zusammen mit den Lücken-Genen sind die Paarregel-Gene an der Kontrolle der homöotischen Selektorgene beteiligt. Auf der letzten Stufe der Regulationskaskade der Segmentierungsgene liegen die Segmentpolaritätsgene. Sie sind verantwortlich für die Untergliederung des Körpers in 14 Kompartimente, die morphologisch als Parasegmente (PS) sichtbar werden.

Die Produkte der maternalen Gene und Segmentierungsgene dienen der zeitpunktgenauen Aktivierung der homöotischen Selektorgene innerhalb des *Drosophila*-Embryos, welche für den segmentspezifischen Determinierungszustand im larvalen und adulten Tier verantwortlich sind. Die wichtigsten homöotischen Gene sind in zwei Komplexen angeordnet: Die fünf Gene des Antennapedia-Komplexes (ANT-C: *labial*, *proboscipedia*, *Deformed*, *Sex combs reduced* und *Antennapedia*) werden für die Entwicklung der Kopf- und vorderen Thoraxsegmente benötigt, während die drei Gene des Bithorax-Komplexes (BX-C: *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) und *Abdominal-B* (*Abd-B*)) für die Differenzierung der posterioren thorakalen und abdominalen Segmente verantwortlich sind (Kaufman et al., 1990). Gemeinsam werden die beiden Komplexe auch als HOM-Komplex (HOM-C) bezeichnet.

1.1.2 Der Bithorax-Komplex

Der Bithorax-Komplex lokalisiert auf dem dritten Chromosom (Akam, 1989) und erstreckt sich über ungefähr 300 kb (siehe Abb. 1.1). Seine homöotischen Gene werden während des zellulären Blastoderm-Stadiums in genau definierten Domänen aktiviert und bestimmen die Identität der PS 5 bis 14. Daneben besteht der Komplex vorwiegend aus *cis*-regulatorischen Sequenzen wie z.B. infra-abdominal Regionen, die für eine Feinabstimmung der homöotischen Gene nötig sind. Homöotische Gene aktivieren Differenzierungsgene, die den Aufbau larvaler bzw. adulter Strukturen, wie z.B. der Beine, Flügel oder Antennen regeln (Lawrence, 1994). Die homöotischen Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die eine DNA bindende Homöodomäne (Helix-Turn-Helix-Motiv) besitzen. Über diese wird sequenzspezifisch die Transkription der Zielgene reguliert (Gehring et al., 1990; Levine und Hoey, 1988; Hayashi und Scott, 1990). Dabei können die Produkte der homöotischen Selektorgene als molekulare Adressen aufgefasst werden, deren segment- und gewebespezifische Aktivität durch komplexe Regulationsmechanismen verwirklicht wird.

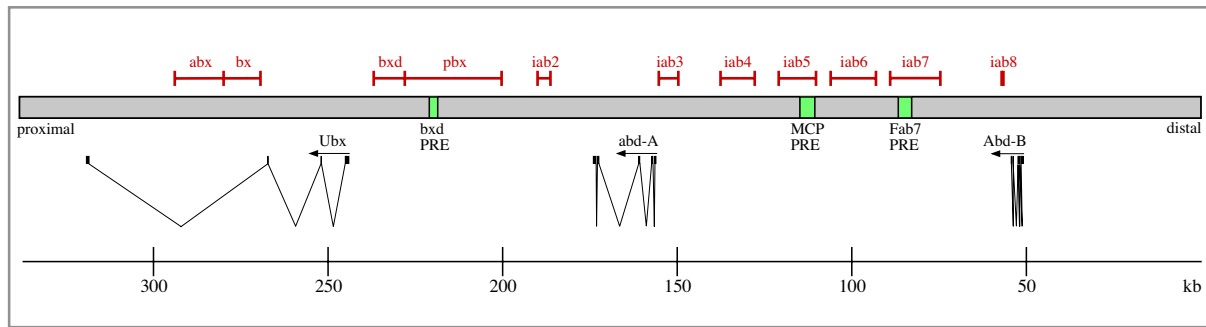


Abb. 1.1: Der Bithorax-Komplex (BX-C) erstreckt sich über 300 kb und kodiert für drei homöotische Gene: *Abd-B*, *abd-A* und *Ubx* (schwarz). „Polycomb Response Elements“ (PREs) sind als grüne Kästchen abgebildet, *cis*-regulatorische Sequenzen als rote Balken.

Auffällig ist die Organisation der Gene und ihrer regulatorischen Sequenzen im BX-C. Ihre Anordnung entspricht der Reihenfolge der anterioren Grenzen ihrer funktionellen und Expressions-Domänen. Für *Ubx* liegt sie in PS 5, für *abd-A* in PS 7 und *Abd-B* in PS 10 (Macias et al., 1990; White et al., 1985; Beachy et al., 1985; Brower et al., 1987; Celniker et al., 1989; Karch et al., 1990; Sanchez-Herrero, 1991; Boulet et al., 1991). Bei Mutationen der homöotischen Gene und/oder deren *cis*-regulatorischer Einheiten werden Segmente oder Gewebe des Körpers zu Strukturen transformiert, die in andere Positionen gehören. Mit der Analyse verschiedener Mutationen der regulatorischen Elemente konnte gezeigt werden, welche *cis*-regulatorischen Sequenzen welche Parasegmente kontrollieren. *abx/bx* kontrolliert PS 5, *bxd/pbx* PS 6 und *iab-2* bis *iab-9* die PS 7 bis 14.

Das Kolinearitätsmodell nach Lewis besagt, dass in der jeweils vom BX-C kontrollierten Domäne bei jedem weiter posterior gelegenen Parasegment ein zusätzliches regulatorisches Element aktiviert wird (Lewis, 1978). Man geht davon aus, dass jedes Element aus einer Anzahl von Enhancern, aber auch „Silencern“ und „Boundaries“ besteht, welche die Expression des betreffenden Gens, je nach Zelltyp, spezifisch reguliert (Pfeifer et al. 1987; Crosby et al., 1993). Die sogenannten „Boundary“ Elemente wurden innerhalb des BX-C durch Analyse von Deletionsmutanten verschiedener *iab* Abschnitte entdeckt (Gyurkovics et al., 1990). Generell werden viele Gene unabhängig von der Entfernung des Promotors zu ihrem „Enhancer“ aktiviert. „Enhancer“ sind regulatorische Schlüsselemente, die Chromatin-induzierte Reprimierung auflösen oder abschwächen und den Zugang der Transkriptionsmaschinerie an Promotoren erleichtern. Dabei muss die vom Enhancer ausgeübte Funktion streng kontrolliert und auf ein begrenztes Territorium limitiert werden. Diese Aufgabe erfüllen Elemente, die im Kontext von ihrer Wirkung auf Enhancer auch als „Insulators“, sprich Isolatoren bezeichnet werden, bei der Abgrenzung von ausbreitendem Heterochromatin hingegen als Boundary-Elemente. In letzterem Falle wird nicht die Aktivierung, sondern die Ausbreitung reprimierender übergeordneter Strukturen, wie Heterochroma-

tin, verhindert. Boundary Elemente sind meist mit DNase hypersensitiven Schnittstellen assoziiert, d.h. ihre DNA ist sensitiver gegen Behandlung mit DNaseI. Im allgemeinen sind exprimierte Gene für *trans*-wirkende Faktoren leichter zugänglich als transkriptionell inaktive (Flint et al., 1977). Boundary-Elemente teilen Chromosomen in strukturelle und funktionelle Domänen auf. Es handelt sich dabei um eine Art Abschirmung oder Barriere zu benachbarten regulatorischen Domänen, die sich in einem unterschiedlich aktivierten Zustand befinden (Galloni et al., 1993). Bei einigen Elementen können auch beide Aktivitäten gemeinsam vorliegen, in anderen Fällen sind sie trennbar. Als Boundary im BX-C ist neben *Mcp* und *Fab7* nun auch das *Fab8* identifiziert (Barges et al., 2000). Die meisten Mutationen von *cis*-regulatorischen Domänen im BX-C führen zu „Loss-of-Function“ Phänotypen (d.h. einem Funktionsverlust des betreffenden Gens).

Das *Frontabdominal 7 (Fab7)* Element stellt diesbezüglich jedoch eine Ausnahme dar. Im Falle einer 4 kb Deletion von *Fab7*, resultiert dies in einer „Gain-of-Function“ Mutation (Überexpression oder falsche Expression), bei der das Parasegment 11 zu PS 12 transformiert (Gyurkovics et al., 1990). Dabei fusionieren die *cis*-regulatorischen Domänen *iab-6* und *iab-7* zu einer gemeinsamen regulatorischen Einheit, was zur Missregulation von *Abd-B* in PS 11 führt. Mit anderen Worten, dort wo normalerweise nur *iab-6* seine Funktion ausübt, tritt nun auch *iab-7* in Kraft. Auch kleinere Deletionen dieses Abschnittes sind dominant und transformieren in der Regel PS 11 zu einem Duplikat von PS 12, jedoch ist bei einigen Deletionen ein komplexer Phänotyp zu beobachten, bei dem sich „Gain-“ und „Loss-of-Function“ vermischen (Mihaly et al., 1997, siehe auch Review von Mihaly et al., 1998). Allgemein lässt sich sagen, dass sich das *Fab7* Element in Enhancer Blockierungs-Experimenten klassischen Isolatoren wie z.B. *su(Hw)* ähnlich verhält (Hagstrom et al., 1996), jedoch gewiss eine größere Rolle bei der Sicherstellung der autonomen Aktivitäten von *iab-6* und *iab-7* einnimmt. Transgenstudien zeigten ein distal zum Boundary Element lokalisiertes Polycomb Response Element (PRE), welches als starker „Silencer“ (Repressor) agiert (Zink et al. 1995). Möglicherweise reprimiert *Fab7* das *iab-7* in allen anterior von PS 12 gelegenen Parasegmenten.

1.1.3 Die Aufrechterhaltung determinierter Expressionsmuster

Die Produkte der maternalen Gene und der Segmentierungsgene sind nur transient vorhanden und während der späten Embryogenese nicht mehr nachzuweisen. Die von ihnen kontrollierten homöotischen Gene müssen jedoch während der gesamten restlichen Embryonal- und

Larvalentwicklung aktiv sein. Replikation und Mitose lösen die Chromatinstruktur und Architektur des Zellkerns weitgehend auf und können so einer ungewünschten Neuprogrammierung von ursprünglich transkriptionsaktiven Domänen führen.

Für die Phase der Aufrechterhaltung des Expressionsmusters scheinen andere Gene in die Regulation einzugreifen. Es wurden zwei dafür verantwortliche Gengruppen isoliert, die nach ihrer Funktion unterschieden werden: Die Mitglieder der trithorax-Gruppe (trxG) bewirken als positive Regulatoren die Erhaltung der homöotischen Genexpression, während die Mitglieder der Polycomb-Gruppe (PcG) als negative Regulatoren dienen und reprimierende Funktionen ausüben. Nach Abschluss des eigentlichen Musterbildungsprozesses und Reduzierung der Expression der Segmentierungsgene treten somit die Gene der Polycomb- (Jürgens, 1985; Paro, 1996) und der Trithorax-Gruppe (Kennison, 1995) in Kraft, um das etablierte Expressionsmuster der homöotischen Gene des ANT-C und BX-C aufrechtzuerhalten. PcG und trxG Proteine sind ubiquitär exprimiert und müssen daher speziellen Mechanismen unterworfen sein, um ihre Zielgene während einer Zellteilung spezifisch, entweder im aktiven oder reprimierten Zustand zu halten.

1.1.3.1 Die trithorax-Gruppe

Den Mitgliedern der trithorax-Gruppe (trxG) wird eine positive Regulation, d.h. Aufrechterhaltung der Expression der homöotischen Gene des ANT-C und des BX-C zugeschrieben. Man nimmt an, dass die Produkte der trxG Bestandteile eines Proteinkomplexes darstellen, der an der Aufrechterhaltung transkriptionell aktiver Chromatinabschnitte mitwirkt, indem Transkriptionsfaktoren Zugang zur DNA ermöglicht wird (Travers et al., 1994). Mutanten dieser Gengruppe resultieren in Embryonen, die anteriore Transformationen zeigen. Grund dafür ist eine ungenügende Expression der homöotischen Gene (Shearn, 1989; Ingham 1998), denn der Phänotyp entspricht „Loss-of-Function“-Mutationen von Genen des HOM-Komplexes. Das TRX-Protein enthält drei Zinkfinger-ähnliche Domänen, die PHD-Finger (Mazo et al., 1990; Aasland et al., 1995) und interagiert vermutlich spezifisch mit chromosomalen Abschnitten, jedoch ist der molekulare Mechanismus noch nicht geklärt. Darüber hinaus besitzt TRX mehrere konservierte Proteinmotive, die ebenfalls in anderen chromosomalen Proteinen gefunden wurden und wahrscheinlich an Veränderungen der Chromatinstruktur beteiligt sind. Zu diesen zählen der PEV-Modulator Su(var)3-9 (Tschiersch et al., 1994), die PcG-Proteine Enhancer of zeste [E(z)] (Jones und Gelbart, 1993) und Polycomblake (PCL) (Lonie et al., 1994). Auch das Brahma-Protein, das *Drosophila*

Homolog der ATPase Untereinheit des Hefe SWI/SNF „Chromatin Remodeling Komplexes“ ist an der Regulation von Chromatinstrukturen beteiligt (Peterson und Herskowitz, 1992; Elfring et al., 1998; siehe auch Review von Kingston et al., 2001). Ein weiteres interessantes Mitglied der *trxG* ist der vom *Trl*-(*trithoraxlike*) Gen codierte GAGA Faktor. Das GAGA-Protein ist an der Transkription zahlreicher *D. melanogaster* Gene, wie *hsp70*, *hsp26* und *Ubx* beteiligt. Es zeigt ebenfalls Aktivität zur Öffnung von Chromatinstrukturen und bindet spezifisch an GA/CT-reiche Sequenzen vieler *Drosophila*-Promotoren (O'Brien, 1995; Granok et al., 1995). GAGA kann zusammen mit dem NURF-Komplex, einer Art „Remodeling“-Komplex, Chromatin öffnen (Wu et al., 1997). Weiterhin konnte ebenfalls gezeigt werden, dass GAGA an einigen Stellen mit PC kolokalisiert (Strutt et al., 1997). Ausgehend von seiner Bindung breitet sich der Faktor vermutlich entlang des induzierten Gens aus und modifiziert so vorhandene reprimierte Chromatinstrukturen (siehe auch Review von Kingston et al., 1996). Postuliert wurde ebenfalls, dass die *trxG* Proteine über spezifische DNA Abschnitte interagieren, die als „*trxG* Response Elements“ (TREs) bezeichnet werden (Chan et al., 1994).

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen an Polytänchromosomen sowie X-ChIP (Formaldehyde Crosslinking Chromatin Immunoprecipitation) Analysen zeigten, dass *trxG* und *PcG* Proteine an den gleichen, Zellgedächtnis-vermittelnden, regulatorischen Sequenzen kolokalisieren können (Chang et al., 1995; Chinwalla et al., 1995; Strutt et al. 1997; Orlando et al. 1998). Die funktionelle Analyse eines dieser Module zeigte jedoch, dass die TRE (*trithorax* Response Element) und PRE Aktivität getrennten DNA Elementen zugeordnet werden konnten, obwohl sie nur 30-40 Nukleotide voneinander entfernt liegen (Tillib et al., 1999).

1.1.3.2 SWI/SNF - *trxG* Homologe in Hefe

Homologe Proteine der *trxG* finden sich, wie oben angedeutet im Hefe SWI/SNF „Chromatin Remodeling Complex“. Der SWI/SNF-Multiproteinkomplex von 2 MDa besteht aus den Produkten mehrerer Gene, die ursprünglich in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* anhand von Defekten in der Bildung des Paarungstypus (*mating type switching*) und/oder in der Sukrose-Fermentation (*sucrose non-fermentor*) identifiziert wurden. Der SWI/SNF-Komplex besteht aus ca. elf Komponenten und nutzt seine aus ATP-Hydrolyse gewonnene Energie zur Dekondensierung der Chromatinstruktur seines Zielgenes (Kingston et al., 1996). SWI/SNF ist ein hochkonservierter Komplex, dessen Homologe in *D. melanogaster* (z.B. die Proteinprodukte

der *trxG*-Gene *brahma*, *mor* und *osa*) und *H. sapiens* aufgereinigt wurden (Kingston et al., 1999). Einige Chromatin modifizierende Faktoren wie z.B. Komponenten des SWI/SNF-Komplexes weisen signifikante Homologien zu DNA-Helikasen auf, besitzen aber keine Helikase-Aktivität (Shen et al., 2000). Zusammen mit Topoisomerase II führt der Komplex negative superhelikale Windungen in die DNA ein und stört so den DNA-Protein Kontakt und ändert dadurch die Topologie der DNA lokal, indem er Nukleosomen entlang der DNA verschiebt. Bemerkenswerterweise wurde in *Drosophila* kürzlich auch die Kolokalisation von Topoisomerase II mit PC an einem PRE/TRE nachgewiesen (Breiling et al., 2001; Lupo et al., 2001). Wie jedoch die nukleosomale Struktur letztendlich mechanistisch verändert wird, ist noch nicht geklärt. Zur Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes an seine Zielgene (< 5 % aller Gene im Hefe) gibt es einige Modelle. Möglicherweise wird der Komplex in einer Assoziation mit dem RNA Polymerase II (Pol II) Holoenzym rekrutiert, denn sowohl der Hefe als auch der humane SWI/SNF-Komplex konnten mit Pol II ko-immunopräzipitiert werden (Wilson et al., 1996). Neben diesem „Holoenzym-Modell“ wird in letzter Zeit aber das einfachere „Aktivator-Modell“ favorisiert. Hier konnte gezeigt werden, dass Gen-spezifische Aktivatoren SWI/SNF direkt an die Zielgene rekrutieren. So interagiert SWI/SNF direkt mit einigen Transkriptionsaktivatoren, wie beispielsweise SWI5 oder GAL4-VP16 (Yudkovsky et al., 1999). Genetische Studien haben belegt, das Komplexe der SWI/SNF Familie kontinuierlich benötigt werden, um die Transkription der Zielgene aufrechtzuerhalten (Sudarsanam et al., 1999).

1.1.3.3 Die Polycomb-Gruppe

Die Gruppe der Polycomb Gene (PcG) wirkt antagonistisch zur *trxG* und reprimiert die homöotischen Gene des ANT-C und BX-C. Allen PcG-Mitgliedern ist gemeinsam, dass sie an der Modifikation der Chromatinstruktur beteiligt zu sein scheinen (Duncan, 1982; Jürgens, 1985; Dura et al., 1987; Müller und Bienz, 1991; Zhang und Bienz, 1992; Simon et al., 1992; Simon et al., 1993; Zink et al., 1991; Orlando und Paro, 1993). Auch die Proteine der PcG üben wie die Proteine der *trxG* ihre Funktion in großen Multiproteinkomplexen aus (Franke et al., 1992; Kingston et al., 1996; Kyba et al., 1998). Die reprimierende Wirkung, auch „Silencing“ genannt, erfolgt indirekt in einem räumlich und zeitlich geordneten Prozess durch Heterochromatisierung spezifischer DNA-Abschnitte. Dieser Vorgang nimmt seinen Ursprung in bestimmten DNA-Sequenzen, den sogenannten PREs (Polycomb group Response Elements) (Simon et al., 1993; Strutt et al., 1997; Orlando et al., 1998), bzw. „Cellular

Memory Modules“ (CMMs) (Cavalli und Paro 1998) auf die im Anschluss noch detaillierter eingegangen wird. Eine Ausbreitung der PcG Komplexe ausgehend von PREs, könnte somit zur Ausbreitung der heterochromatinähnlichen Struktur führen. PcG-Mutanten zeigen homöotische Mutationen, weil das korrekte HOM-C-Expressionsmuster ohne die PcG nicht aufrechterhalten werden kann und demzufolge als ektopische Expression der homöotischen Gene zum Ausdruck kommt. Dabei werden anterior in posterior gelegene Segmente transformiert. Namensgebend für die Polycomb-Gruppe war das nukleare 390 Aminosäuren umfassende Protein Polycomb (PC) (Paro und Hogness, 1991), das Sequenzhomologien zu HP1 (Heterochromatin-assoziiertes Protein 1) aufweist. HP1 wird vom Gen *Su(var)205* (Eissenberg et al., 1992), einem Suppressor der Positions-Effekt-Variegation (PEV) codiert. Beiden Proteinen gemeinsam ist die 50 Aminosäure große Chromodomäne (Paro und Hogness, 1991), die auch in vielen anderen eukaryontischen Proteinen gefunden wurde (Singh et al., 1991; Pearce et al., 1992). Die Gemeinsamkeit mit HP1 lässt auf eine ähnliche Funktion des Polycomb-Proteins, bezüglich der Heterochromatisierung und stabilen Reprimierung der homöotischen Gene über mehrere Zellgenerationen hinweg, schließen. Die Proteine der PcG sind somit an einer Art zellulärem Gedächtnis beteiligt.

An Polytänochrosomen konnte gezeigt werden, dass die PcG-Proteine PC, PH, PSC und PCL an ca. 100 oft übereinstimmenden Orten gebunden sind (Franke et al., 1992; Rastelli et al., 1993; Lonie et al., 1994). Darunter sind viele Bindestellen im Bereich homöotischer Gene des Antennapedia- und Bithoraxkomplexes (Zink und Paro, 1989). Außerdem konnte mittels X-ChIP (Orlando und Paro, 1993) gezeigt werden, dass PC *in vivo* an die homöotischen Gene *Ubx*, *abd-A* und *Abd-B* des Bithorax-Komplexes bindet. Auch weitere Bereiche von Genen, die in diesen Zellen reprimiert sind, weisen PC-Bindung auf. Regulatorische Elemente, wie z.B. die des in SL2-Zellen aktivierten *Abd-B*-Gens, sind hingegen frei von Polycomb. Die Regulation der Bindung von PcG-Mitgliedern geschieht, wie gesagt über „PcG Response Elements“, die PREs. Beispiele für diese regionspezifischen Silencing Elemente wurden innerhalb des homöotischen Gens *Ubx* und in der Umgebung des *Abdominal-B* Gens identifiziert: Das Fragment *BXD* in *Ubx* und nahe von *Abdominal-B* die Fragmente *MCP* und *Fab7* (Karch et al., 1994; Busturia und Bienz, 1993). Zusätzlich benötigt der Vorgang des Silencing neben PC auch noch andere Faktoren wie z.B. das Hunchback (HB) Protein, um die segmentspezifische *Abd-B* Expression während der Embryogenese zu gewährleisten. Die Ähnlichkeiten zwischen den Kontrollmechanismen von *Abd-B* und *Ultrabithorax* (*Ubx*) deuten auf ein universelles Prinzip der Regulation homöotischer Gene hin.

Interessanterweise konnte der repressorischen Domäne, dem C-Terminus des PC Proteins, eine spezifische Interaktion mit Histonen zugewiesen werden (Breiling et al., 1999). Die Wechselwirkung erfolgt über die N-Termini der Histone. Die N-Termini der Histone stellen die Orte der regulativen Histon-Modifikation dar. Dort könnten PC Multiproteinkomplexe eine epigenetische Markierung bewirken und modifizierende Proteine an Chromatin rekrutieren.

1.1.3.4 Epigenetik und der Histon-Code

Histone können auf vielfältige Weise posttranslationell modifiziert werden. Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Poly-ADP-Ribosylierung und Ubiquitinierung bestimmter Aminosäuren sind gängige Merkmale, um die Verpackung und Funktion von Chromatin zu steuern (Grunstein, 1997; Howe et al., 1999; Jenuwein und Allis, 2001). Die Modifikationen befinden sich vorwiegend in den sogenannten „Histon Tails“, den aus den Nukleosomen herausragenden N-Termini (Fletcher und Hansen, 1996, Kornberg und Lorch, 1999). Von Hefe bis zum Menschen sind die Positionen der modifizierten Aminosäuren der Histone stark konserviert. Die Zahl der Protein-kodierenden Gene beträgt in der Fruchtfliege ungefähr 22000 und beim Menschen mindestens doppelt soviel. Der Schluss liegt nahe, dass die DNA und alternatives Spleißen alleine, für die Fülle an benötigter Information zur Entwicklung solch komplexer Organismen nicht ausreicht. Modifizierungen auf der Ebene DNA-verpackender Proteine, insbesondere der Histone, können somit den genetischen Informationsspeicher erweitern und vor allem zur gewebspezifischen und zeitlich korrekten Genexpression beitragen. Vielfach spricht man dabei von einem sogenannten „Histon Code“, einer epigenetischen Kennzeichnung. Unter Epigenetik versteht man die Steuerung der Genexpression über Änderungen der Chromatinstruktur oder über biochemische Modifizierungen der DNA und der Histone. Dieser Zustand ist vererbbar, zugleich aber potentiell reversibel und nicht an der DNA Sequenz selbst zu erkennen. Epigenetische Mechanismen erlauben also eine vererbbare Veränderung der Genexpression ohne die DNA Sequenz selbst zu modifizieren (Wolffe und Matzke, 1999).

Besonders die Modifizierung der Histone H3 und H4 scheint eine wichtige Rolle bei der Heterochromatinbildung zu spielen. Eine der meist untersuchten Modifizierungen ist die Acetylierung. Man muss dabei zwischen Histon-Acetylierung über große Bereiche und lokal gerichteter Acetylierung unterscheiden. Bislang ist bekannt, dass *in vitro* Acetylierung der Histone H3 und H4 der Verpackung in hoch kompaktes Chromatin entgegenwirkt (Garcia-

Ramirez et al., 1995; Tse et al., 1998) und acetyliertes Chromatin *in vivo* allgemein zugänglicher ist, da es erhöhte Sensitivität gegenüber DNase I zeigt (Krajewski und Becker, 1998). In ausdifferenzierten Zellen besteht der größte Teil des Genoms aus hypoacetyliertem inaktiven Chromatin und stellt vermutlich den Grundzustand dar. Die Aktivierung von konstitutiv exprimierten- („house-keeping“) und Zelltyp-spezifischen Genen bedarf der Histonacetylierung über weite Chromatindomänen. Der β -Globin Locus (siehe auch Kap. 1.2.2) beispielsweise zeigt Histonacetylierung über ausgedehnte Bereiche mit definierten Grenzen, was für die transkriptionelle Kompetenz von Bedeutung ist (Litt et al., 2001; Schübeler et al., 2001). Ähnliches ist bekannt von der Dosiskompensation in *Drosophila*. Hier wird nicht wie bei Säugern ein weibliches X-Chromosom inaktiviert, sondern das männliche X-Chromosom doppelt so stark exprimiert. Dieser Zustand spiegelt sich am männlichen X-Chromosom in der Acetylierung des Histons H4 (Lysin 16) durch MOF (Males absent on the first) wider (Akhtar und Becker, 2000; Smith et al., 2001). Es ist anzumerken, dass Acetylierung der Histone H3/H4 nicht zwingenderweise mit aktiver Transkription korreliert, sondern vielmehr Bereiche darstellt, die potentiell zur Transkription fähig sind.

Lokal gerichtete Acetylierung äussert sich oft in der Modifikation von Histonen an Promotorsequenzen (Brown et al., 2000; Forsberg und Bresnick, 2001), wobei auch Ausnahmen bekannt sind. So wurde beispielsweise bei Gal4 aktivierten Hefepromotoren eine Abnahme der Histon H4 Acetylierung beobachtet, wobei die Acetylierung von H3 unverändert blieb (Deckert und Struhl, 2001). Eine allgemeine Schlussfolgerung ist hier nicht möglich.

Vorausgesetzt Histonacetylasen (HATs) spielen als Ko-Aktivatoren der Transkription und Histondeacetylasen (HDACs) bei der Reprimierung eine Rolle, so müssen sie doch zuerst an ihre Zielsequenzen dirigiert werden. Mittlerweile ist von einigen Transkriptionsfaktoren bekannt, dass sie in der Lage sind, HAT-Aktivität an spezifische Promotoren zu rekrutieren (Brown et al., 2001). Ferner wurde HAT-Aktivität der RNA Polymerase II selbst gefunden (Wittschieben et al., 1999). HDACs werden beispielsweise über Repressorproteine wie z.B. der Mad Familie an ihre Zielsequenz geleitet oder sind konstitutiv mit Chromatin assoziiert (Li et al., 2002). Grundsätzlich ist von Histonacetylierung bekannt, dass sie zu einem geänderten Verpackungsgrad der Nukleosomen führt und so Chromatin zugänglicher macht. In der Folge könnte die Transkriptionsmaschinerie Promotoren leichter erreichen.

Neben der Acetylierung von Histonen spielt auch die Phosphorylierung und Methylierung eine tragende Rolle in der epigenetischen Regulation. Es ist denkbar, dass die HAT Aktivität selbst über Phosphorylierung oder Acetylierung gesteuert wird (Cheung et al., 2000; Kouzarides, 2000). Daneben hat die Phosphorylierung von Nukleosomen Auswirkungen auf

die Organisation des Chromatins bestimmter Regionen. So ist beispielsweise bekannt, dass Phosphorylierung und Acetylierung am selben N-Terminus nebeneinander existieren können (Clayton et al., 2000). Ferner wird Phosphorylierung für die korrekte Segregation der Chromosomen benötigt (Hsu et al., 2000).

Neben den beschriebenen Histonmodifikatoren stellen die Histon Methyltransferasen (HMTs) einen weiteren wichtigen regulierenden Faktor dar. Die Säugerhomologe des *Drosophila* Su(var)3-9, ursprünglich als Suppressor der Positions Effekt Variegation (PEV) identifiziert, methylieren spezifisch das Histon H3 am Lysin 9 (Rea et al., 2000). Interessanterweise wurden dessen Säugerhomologe Suv39h1 und SUV39H1 mit M31 assoziiert gefunden (Aagaard et al., 1999). M31 ist das Homolog von HP1, eines der Schlüsselproteine bei der Heterochromatisierung. Es bindet über seine Chromodomäne spezifisch an Lysin 9 methylierte N-Termini des Histons H3 und scheint so am Erhalt von Heterochromatin beteiligt zu sein. Das PC Protein verfügt nicht über diese Fähigkeit (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Auch zwischen Histonacetylierung und -methylierung scheint ein Zusammenspiel möglich zu sein, was durch die Interaktion der Acetyltransferase CBP (CREB binding protein) und Histonmethylase-Aktivität angedeutet wird (Vandel und Trouche, 2001). Histonacetylierung und nachträgliche Methylierung scheinen koordinierte Aktivitäten zu sein, da sie im selben Komplex vorliegen können (Czermin et al., 2001). Im Falle von Reprimierung ist aber auch eine Situation denkbar, in der Methylierung einer bestimmten Aminosäure eine Acetylierung ausschließt und so möglicherweise Heterochromatin Protein 1 (HP1) auf sich lenkt (Eberharter und Becker 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung einen wichtigen Code zur Erkennung und Bindung Chromatin-regulierender Faktoren darstellt.

1.2 Parallelen zu anderen *cis*-regulatorischen Systemen

Im nächsten Abschnitt werden Beispiele von Regulationsmechanismen aus anderen Modellsystemen beschrieben. Sie ähneln dem unter anderem dadurch BX-C, da sie auch als Gencluster angeordnet sind.

1.2.1 Die *Hox*-Gene

Ein dem Kolinearitätsprinzip des HOM-C strukturell und genetisch homologes System sind die *Hox*-Gene der Vertebraten. Es handelt sich dabei um eine Familie von Transkriptionsfaktoren mit Homöobox-Domäne (Krumlauf et al, 1994). Mittlerweile sind ca. 40 dieser Gene in Säugern bekannt. Sie sind in vier relativ kurzen „Clustern“ (Hox A bis Hox D) angeordnet. Bemerkenswert ist die Anordnung der Gene innerhalb der verschiedenen Cluster. Alle Gene jedes einzelnen Clusters haben dieselbe transkriptionelle 5' - 3' Orientierung. Am 3' Ende des Komplexes liegende Gene werden in den anterioren Domänen des Embryos exprimiert, wobei die benachbarten 5' gelegenen Gene schrittweise in begrenzten weiter posterior gelegenen Regionen transkribiert werden (Gaunt et al., 1989; Duboule et al., 1989; Graham et al., 1989). Erstaunlicherweise wird diese Linearität in einem chronologischem Expressionsmuster widergespiegelt: 3' liegende Gene werden früher als die 5' liegenden Gene exprimiert (Izpisua-Belmonte et al., 1991). Es scheint folglich einen engen Zusammenhang zwischen der chromosomalen Anordnung der *Hox*-Gene und ihrer zeitlichen und räumlichen Regulation zu geben. Während das zeitliche sequentielle Expressionsmuster der *Hox*-Gene vermutlich in allen Metazoen existiert, die sich chronologisch entlang einer rostral-kaudalen Achse entwickeln (Duboule, 1994), fehlt diese zeitlich Komponente im BX-C. Im Falle einiger posterior gelegener *Hox*-Gene wurde gezeigt, dass deren lineare Aktivierung der Regulation von *Abd-B* gleicht (Kondo et al., 1998). Die dafür verantwortlichen regulatorischen Mechanismen des BX-C und der posterior gelegenen Abschnitte des *Hox D* Komplexes scheinen somit stark konserviert zu sein.

Wie die homöotischen Gene in *D. melanogaster* müssen auch die *Hox*-Gene von Säugern während der Entwicklung ihren, einst durch die Lücken-Gene determinierten, Expressionszustand aufrechterhalten. Erzielt wird das über die Säugerhomologe der PcG, die hier Bestandteile zweier unterschiedlicher Komplexe sind. Einer enthält den Eed Komplex (Ortholog von *Drosophila extra sexcombs*), Enx1 und Enx2 (Homologe von *Drosophila enhancer of zeste*) (Schumacher et al., 1996; Hobert et al., 1996; Laible et al., 1997; Sewalt et al., 1998; van Lohuizen et al., 1998). Der zweite Komplex enthält beispielsweise die hochkonservierten Genpaare *Mel18* und *Bmi1* (Homologe von *Drosophila Posterior sex combs*), *M33/Cbx2* und *HPc2/Mpc2*, *rae28/Mph1* und *Hph2/Mph2*, sowie Ring1A und Ring1B (van Lohuizen et al., 1991; Pearce et al., 1992; Satijn et al., 1997; Nomura et al., 1994; Gunster et al., 1997; Hemenway et al., 1998; Schoorlemmer et al., 1997). Dieser Komplex weist große Ähnlichkeit zum „Polycomb repressive complex 1“ (PRC1) aus *Drosophila* auf (Saurin et al., 2001). Mäuse mit PRC1-Defizienzen (für einzelne Komponenten von PRC1) zeigen Ver-

schiebungen der anterioren Expressionsdomänen ihrer *Hox*-Gen Cluster, was letztendlich in posterioren Transformationen des axialen Skeletts sichtbar wird (van der Lugt et al., 1994; Takihara et al., 1997). Der Komplex vermittelt wie die *Drosophila* Homologe den Erhalt der Expressionsdomänen der *Hox*-Gene, ist aber nicht initiativ repressiv wirksam (Akasaka, et al. 2001).

1.2.2 Der β -Globin Locus

Die 70 kb große β -Globin Domäne ist ein gutes Beispiel dafür, wie Chromatinkonformationen durch ein Boundary-Element begrenzt werden können. Die Chromatinstrukturen des β -Globin-Lokus im Modellsystem Huhn sind denen des BX-C vergleichbar. Eine sogenannte „Locus Control Region“ (LCR) steuert die Expression der stromabwärtsgelegenen Gene und besitzt, wie typische Boundary Elemente, DNase I hypersensitive Stellen (Tuan et al., 1985; Forrester et al., 1986). Wie auch Boundary Elemente vermittelt die LCR eine positionsunabhängige Expression von Transgenen. Generell kann man sagen, dass LCRs über Chromatin regulierte Reprimierung abschwächen und Chromatinstrukturen „öffnen“. Sie dekodensieren dabei bis zu 200 kb entfernt liegende Strukturen. Ähnlich dem BX-C, besteht der β -Globin Locus aus fünf aktiven Genen, die ebenfalls in der Reihenfolge ihrer entwicklungsgeschichtlichen Expression angeordnet sind (Gribnau et al., 2000). Jedoch wird zu jedem Zeitpunkt immer nur eins der fünf Gene transkribiert. Interessanterweise wurden in Mäusen mit einem transgenen humanen β -Globin Locus intergenische Transkripte gefunden. Diese können bis zu 30 kb lang sein, sind nahe aktiver Gene zu finden und stehen in engem Zusammenhang mit Chromatinstrukturierung und dem Erhalt aktivierter Domänen (Ashe et al., 1997). Möglicherweise generiert die Transkription eine „offene“ Chromatinstruktur. Andererseits besteht die Hypothese, dass an die LCR gebundene Proteine Faktoren rekrutieren und so das Chromatin des gesamten β -Globin Locus auflockern (Travers, 1999).

1.3 Das Zellgedächtnis

1.3.1 Polycomb Response Elemente (PREs) als chromosomale Gedächtnisträger

Wie schon oben erwähnt üben die Proteine der PcG ihre Aufgabe der Genreprimierung initiativ von spezifischen Silencer-Elementen aus, von denen sie sich in benachbartes Chromatin

ausbreiten. Die Tatsache, dass ebenfalls Proteine der *trxG*, wie z.B. GAGA oder beispielsweise auch Topoisomerase II an PREs binden (Strutt et al., 1997; Breiling et al., 2001), warf die Frage auf, ob PREs nicht mehr sind als „Silencer“. PcG und *trxG* Proteine wirken offensichtlich an gemeinsamen chromosomalen Elementen, welche benachbarte Chromatinstrukturen entweder in eine offene, oder kondensierte Form bringen. Dieser Zustand müsste allerdings vererbbar sein, um eine Art Zellgedächtnis bilden zu können.

In einem richtungsweisenden Experiment konnte Cavalli am Beispiel des *Fab7* PREs zeigen, dass *Fab7* nicht nur ein Gedächtnisträger embryonal festgelegter Expressionszustände ist, sondern auch eine Art Modul darstellt, welches Expressionszustände über die gesamte Entwicklung aufrecht erhält (Cavalli und Paro, 1998). Zu diesem Zweck wurde ein duales Transgensystem benutzt, welches die natürliche Regulationskaskade während der Embryonalentwicklung reproduziert (Abb. 1.2).

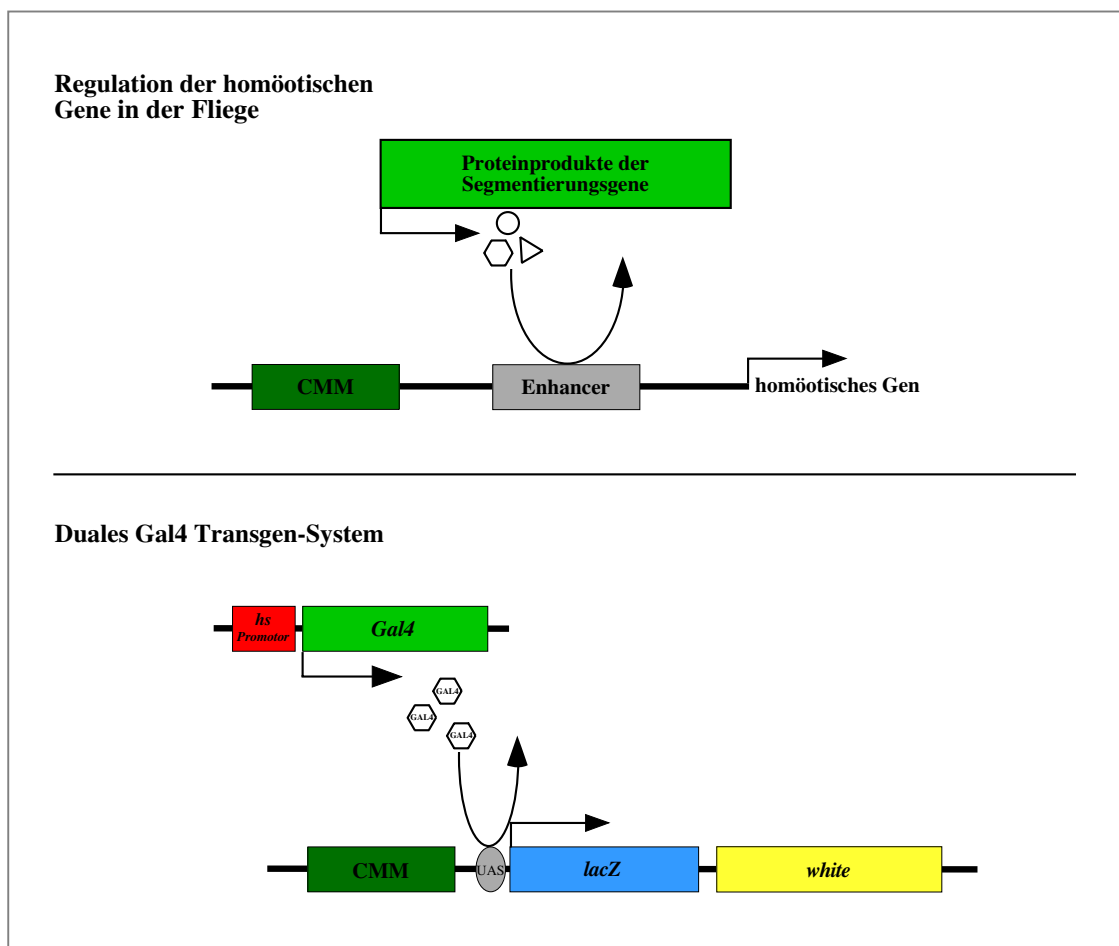


Abb. 1.2: Illustration des dualen GAL4 Systems. Ein kurzer Hitzeschock führt über einen Hitzeschockpromotor (*hs Promotor*) zu transienter GAL4 Expression. Er imitiert die natürliche Situation der frühen, ebenfalls transient exprimierten Segmentierungsgene. Der GAL4 Transaktivator bindet an UAS und ermöglicht so die Transkription der stromabwärts gelegenen Reportergene. Das in dieser Arbeit benutzte duale Gal4 System beschränkt sich auf die beiden Reportergene *lacZ* und *mini-white*, deren Expression über die „Upstream Activation Sequence“ (UAS) gesteuert wird. In diesem System können Chromatin regulierende Elemente wie beispielsweise CMMs studiert werden.

In diesem System enthalten transgene Fliegen zwei Konstrukte. Das erste Transgen produziert nach einem Hitzeschock den Transaktivator GAL4. GAL4 ist ein Hefe Transkriptionsfaktor (Giniger et al., 1985; Johnston, 1987; Selleck et al., 1987). Er bindet über eine sogenannte „Upstream Activation Sequence“ (UAS) und aktiviert den Transkriptionsapparat. Zudem lockert GAL4 höher geordnete Chromatinstrukturen auf (Chen et al., 1993). Im dualen System in *Drosophila* bindet exprimiertes GAL4 über die UAS-Bindungsstellen an ein zweites Transgen. Stromabwärts der UAS befinden sich das Reportergen *lacZ* (produziert β -Galactosidase) und der Transformationsmarker *mini-white*, die so *in trans* aktiviert werden können. Das *mini-white* Gen ist für die Bildung des Augenpigments zuständig. Stromaufwärts der UAS befindet sich das *Fab7* PRE aus dem Bithorax-Komplex.

Ohne Einflussnahme eines Hitzeschocks verhindern die an *Fab7* gebundenen repressorischen PcG-Komplexe die Expression des Reportergens *lacZ*. Auch der benachbarte Marker *white* zeigt reduzierte Expression, was in einer gelben Augenfarbe resultiert. Auf einen Hitzeschock induzierten GAL4 Puls während der Embryogenese hin werden die repressorischen Komplexe entfernt oder umstrukturiert, und man konnte die Dereprimierung nicht nur des *lacZ* Gens, sondern auch des *white* Gens beobachten. Dies ist insofern erstaunlich, weil der Transaktivator GAL4 in Folge des Hitzeschocks, nur transient exprimiert und danach rasch abgebaut wird. D.h., auf das spät in der Puppenphase wirkende *white*-Gen kann das GAL4 Protein nicht mehr direkt gewirkt haben.

Das chromosomale Element *Fab7* muss folglich von einem reprimierten in einen aktivierten Zustand umgeschaltet worden sein und diesen durch die Entwicklung über die Mitose vererbt haben. Erstaunlicherweise kann ein *Fab7* Element seinen spezifischen Chromatinzustand auch über die Meiose in die darauffolgenden Generationen vererben (Cavalli und Paro, 1998). Aus diesem Grund wurde das *Fab7* Schaltelement als „Cellular Memory Module“ (CMM) bezeichnet. Allerdings konnte dieser Zustand nur über die weibliche Keimbahn übermittelt werden, in der männlichen Keimbahn wird das Signal gelöscht. Es handelt sich bei der Übermittlung der festgelegten Expressionszustände von *Fab7* folglich um eine typische epigenetische Vererbung, da sie nicht direkt von der DNA Sequenz, sondern vielmehr von der Chromatinstruktur abhängt. Bei *Fab7* handelt es sich nicht um das einzige CMM im Bithorax-Komplex. Auch die PREs *MCP* und *BXD* zeigen im gleichen Versuchsansatz mitotische Vererbung des aktivierten Zustandes (pers. Mitteilung von M. Prestel).

1.3.2 Epigenetische Markierung eines aktivierten CMMs

Das Umschalten des *Fab7* Elements von einer reprimierten in eine „aktive“ Chromatinstruktur geschieht in Folge des GAL4 Pulses in der frühen Embryogenese. Dieser aktivierte Status bleibt über viele Zellgenerationen erhalten. Ein Umschalten während späterer Entwicklungsstadien ist nicht mehr möglich, hier scheint das Chromatin in einem deutlich stabileren Zustand vorzuliegen. Das Chromatin kann nur noch transient für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht werden, um *lacZ* oder *mini-white* zu exprimieren. Es konnte durch Einkreuzen von *Pc*, bzw. *trxG* Mutationen gezeigt werden, dass der aktivierte Zustand des CMMs von *trx*, jedoch nicht von *Pc* abhängig ist (Cavalli und Paro, 1999). Der Erhalt von Silencing an PREs hingegen ist nicht nur von PcG Proteinen, sondern auch von Chromatinkondensierenden Proteinen wie Barren und Topoisomerase II abhängig (Breiling et al., 2001). PcG-abhängiges Silencing stellt vermutlich den Ausgangszustand an einem CMM dar, wobei während oder nach der Aktivierung, *trxG*- mit PcG-Proteine in ihrer Bindung an *Fab7* konkurrieren können. In Polytänchromosomen verliert das PC Protein, in Folge eines GAL4 Pulses im dritten Instar Larvenstadium, seine Bindung an das *Fab7* Transgen temporär. Nach dem Abbau von GAL4 bindet PC wieder an *Fab-7*, und das UAS-*lacZ* System wird erneut reprimiert. Um das aktivierte *Fab7* CMM epigenetisch zu markieren, kann also nicht das Entfernen der PC Proteine selbst ursächlich sein.

Was kennzeichnet nun ein während der Embryogenese umgeschaltetes CMM?

Es ist verwunderlich, dass der PcG und *trxG* abhängige, epigenetisch determinierte Zustand von *Fab7* auch meiotisch vererbbar ist, da beide Proteingruppen vorwiegend bei der Kontrolle von Entwicklungsgenen von Bedeutung sind. Ein sich entwickelnder Embryo muss normalerweise die epigenetischen Informationen seiner Parentalgameten löschen, um sein eigenes Differenzierungsprogramm störungsfrei verwirklichen zu können. Nur wenige epigenetische Markierungen überdauern die meiotischen Teilungen.

Noch gibt es keine konkreten Hinweise welchen Mechanismen dieses epigenetische Phänomen zugrundeliegt. Eine Methylierung der DNA, wie sie z.B. im Säugergenom bei Silencing oftmals auftritt, wurde anfangs ausgeschlossen, da in *Drosophila* keine DNA-Methylierung in Larven oder Adulten bekannt war. Erst die Entdeckung methylierter DNA in sehr jungen Embryonen lässt diese Möglichkeit dieser epigenetischen Regulierung offen (Lyko et al., 2000). Vermutlich aber handelt es sich bei dem beschriebenen epigenetischen Phänomen um proteinabhängige Vorgänge. Eine weitere biochemische Modifikation auf einer anderen Ebene wäre beispielsweise die Acetylierung von Histonen, die schon bei Hefe im Zusammenhang mit vererbaren Chromatinzuständen beobachtet wurde (Ekwall et al., 1997).

Warum die meiotische Vererbung nur durch die weibliche Keimbahn beobachtet wurde, könnte am Erhalt des Chromatins in Form von Nukleosomen liegen. Während der Meiose in der männlichen Keimbahn werden Histone durch Protamine ersetzt und führen so zu einer Umstrukturierung des Chromatins.

Cavalli und Paro untersuchten daher in Polytänschromosomen als mögliche epigenetische Markierung Histonacetylierung und fanden, dass nur ein embryonal aktiviertes *Fab7* Element stabile Histon H4 Hyperacetylierung aufweist (Cavalli und Paro, 1999). Das Silencing von *Fab7* scheint nach der Embryogenese deutlich stabiler und irreversibel zu sein. Der dem *Fab7* Transgen aufgebrachte epigenetische Stempel ist somit nur in einer kurzen Phase der Entwicklung wirksam.

1.4 Ziele der Arbeit

Mit der H4 Histon Hyperacetylierung des *Fab7* Transgens in Polytänschromosomen von Speicheldrüsen wurde eine Möglichkeit der Markierung des aktivierten Zustandes des CMMs beschrieben. Wie bedeutend diese biochemische Veränderung für die Vererbung des epigenetischen Zustands ist, zu welchem Zeitpunkt sie in Kraft tritt und ob sie in diesem System die einzige Modifikation darstellt, ist noch unklar. Von ebenso großem Interesse ist jedoch die Frage nach dem Mechanismus, der ein CMM von einem reprimierten in einen aktivierten Zustand umschaltet. Es sind mehrere Möglichkeiten vorstellbar: Zum einen biochemische Veränderungen der DNA und der Histone und andererseits eher mechanistisch wirkende Kräfte. Betrachtet man beispielsweise die langen, nichtkodierenden intergenischen Transkripte des β -Globin-Lokus und des BX-C, liegt der Schluss nahe, dass sie nicht ohne Grund evolutionär erhalten sind.

Daher wurde die Frage gestellt, ob bei der Umschaltung des transgenen CMMs Transkription beteiligt ist. Die sich daran anschließende Frage bezieht auch das endogene *Fab7* CMM ein. Wird das CMM für „Remodeling“-Komplexe zugänglich, weil im Falle des Transgens der GAL4 Puls das Chromatin auflockert, und wie geschieht das in der natürlichen Situation innerhalb des Bithorax-Komplexes?

Es ist denkbar, dass PcG-abhängiges Silencing am PRE der Grundzustand ist, der nur durch dort stattfindende Vorgänge verändert werden kann. Im BX-C sind verschiedene RNAs bekannt, die offensichtlich nicht für Proteine kodieren. Darunter befinden sich Transkripte *cis*-regulatorischer Sequenzen (Cumberledge et al., 1990 und Lipshitz et al., 1987). Weiterhin

waren einige andere Transkripte in distal-proximaler (d-p) und eines in p-d Orientierung bekannt (Hogness, unveröffentlichte Daten / persönl. Mitteilung R. Paro). Möglicherweise wirken sie rein regulatorisch.

Im Zusammenhang mit der Frage nach dem Mechanismus, wie ein CMM umgeschaltet werden kann, ist auch von Interesse, welche Untereinheiten des *Fab7* Elements letztendlich die Rolle des funktionellen Gedächtnisträgers übernehmen. Wie bereits erwähnt besteht das *Fab7* Element aus einem ca. 800 bp großen „Silencer“, dem *iab-7* PRE. Unmittelbar proximal befindet sich das Boundary Element, dessen Aufgabe es ist, PS-spezifische *cis*-regulatorische Domänen zu separieren (Hagstrom et al., 1997; Mihaly et al., 1998). Die Herstellung transgener Fliegen mit kürzeren *Fab7* Fragmenten und die Analyse ihrer Eigenschaften wird in der vorliegenden Arbeit beschrieben.

Zusätzlich sollten auch *cis*-regulatorische Sequenzen des BX-C untersucht werden. Die Fragestellung war, ob ihre Funktionen oder Mechanismen mit denen des transgenen CMMs vergleichbar oder assoziiert sind. Daher sollten potentiell regulative RNAs und ihr Expressionsmuster innerhalb des BX-C untersucht und charakterisiert werden.

2 Ergebnisse

Am Beispiel des β -Globin Lokus wurde bereits näher darauf eingegangen, dass nicht translatierte Transkripte *cis*-regulatorischer Sequenzen mit der Kontrolle der Genexpression assoziiert sind. Um festzustellen, ob Transkripte beim Umschalten von CMMs, wie beispielsweise dem *Fab7* Element, eine Rolle spielen, wurde diese Fragestellung mittels verschiedener Methoden angegangen. Dazu standen zwei Systeme zur Verfügung: Das im dualen Gal4 System induzierbare *Fab7* Transgen und das endogene *Fab7* Element in seiner natürlichen Umgebung, dem BX-C. Die *Fab7* Sequenz wurde bis zu diesem Zeitpunkt als rein regulatives Element angesehen, das seine Funktion auf DNA Ebene erfüllt. Von möglichen Transkripten (durch cDNAs oder *in situ* Hybridisierungen) war nichts bekannt.

2.1. *In situ* Hybridisierungen des *Fab7* Elements und *cis*-regulatorischer Sequenzen des BX-C

2.1.1 Das transgene *Fab7* CMM wird bei seiner Aktivierung transkribiert

Zur näheren Charakterisierung des *Fab7* CMMs insbesondere zum Nachweis potentieller Transkripte wurden *in situ* Hybridisierungen ausgeführt. *In situ* Hybridisierungen erwiesen sich in diesem Fall seltener Transkripte als sehr sensitiv und sollten Aufschluss über das Expressionsmuster des transgenen *Fab7* CMM geben.

Die *Fab7* RNA der FLW-1 Linie wurde mit einer DIG-UTP markierten RNA hybridisiert, die das gesamte 3,6 kb *Fab7* Element umfasst. Die Linie FLW-1/*Fab7*¹ ist Träger des *Fab7* Transgens p5F24 25, 2 (vgl. Abb. 2.1 und 2.15) und einer 4 kb Deletion des endogenen *Fab7* Elements. Gal4 aktivierte FLW-1/*Fab7*¹ Embryonen zeigten Transkription durch das CMM in proximal distaler Orientierung. Das Expressionsmuster variierte von unregelmäßiger bis zu homogener Färbung. Im Falle der FLW-1/*Fab7*¹ Linie konnte die *Fab7* RNA in älteren Stadien vorwiegend im zentralen Nervensystem (ZNS) lokalisiert werden. Grundsätzlich handelte es sich um sehr rare Transkripte, da sie sich nur in Slot Blots mit hohen Konzentrationen an polyA⁺ RNA, jedoch nicht in Northern Blots nachweisen ließen (siehe Kapitel 2.3.4). Nicht aktivierte Embryonen hingegen zeigten nur schwache oder keine Expression. Auch die fLW/*Fab7*¹ Linie (p5F3 *Fab7* Konstrukt, vgl. Abb. 2.15) zeigte *Fab7* Transkription in proximal-distaler Orientierung. Folglich exprimieren beide *Fab7* Linien das CMM in der gleichen proximal-distalen Richtung. Die Orientierung des *Fab7* CMMs zur

UAS und den Reportergenen spielte somit keine Rolle. Die Induktion der Transkripte gelang ab dem Stadium der Keimstreifverlängerung und -verkürzung besser als in jüngeren Stadien.

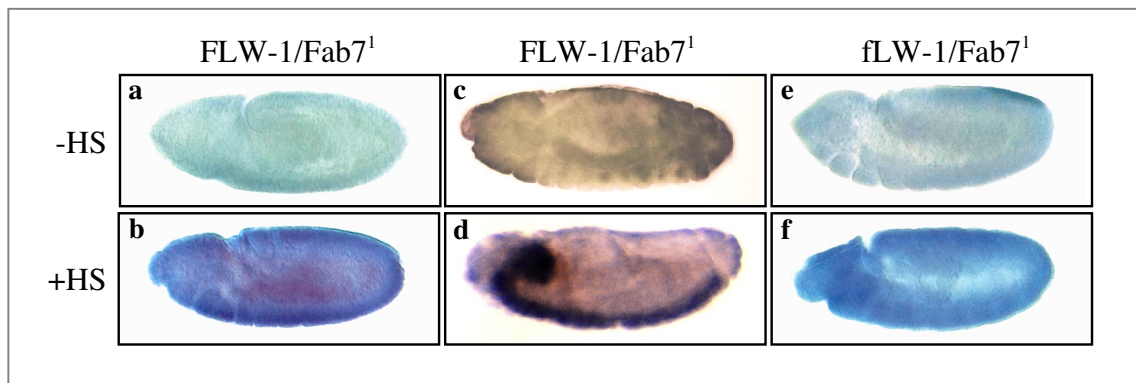


Abb. 2.1: *In situ* Hybridisierung von *Fab7* RNA in transgenen Embryonen. Nach Aktivierung des *Fab7* CMMs wurden Transkripte proximal-distaler Orientierung in FLW-1/*Fab7*¹, als auch in fLW-1/*Fab7*¹ detektiert (+HS). Nicht induzierte Embryonen (-HS) zeigten keine oder geringe Transkription (a, c und e). Das *Fab7* Expressionsmuster der FLW-1/*Fab7*¹ Linie variierte zwischen relativ homogener Färbung im gesamten Embryo (b) und starker Färbung im ZNS (d). Die fLW-1/*Fab7*¹ Linie (e und f) exprimierte *Fab7* im Vergleich zur FLW-1/*Fab7*¹ schwächer, jedoch homogen.

2.1.2 Das endogene *Fab7* Element wird im Embryonalstadium segmentspezifisch transkribiert

Wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, wurde das *Fab7* Transgen in den Linien FLW-1/*Fab7*¹ und fLW-1/*Fab7*¹ nach einem Gal4 Puls in proximal-distaler Orientierung transkribiert. Um mögliche endogene *Fab7* RNAs innerhalb des BX-C nachzuweisen, wurden Wt Embryonen mit *Fab7* Sonden hybridisiert.

Als Sonde diente wiederum die 3,6 kb *Fab7* Sequenz beider Orientierungen. Tatsächlich wird auch das endogene *Fab7* Element transkribiert (Abb. 2.2). Erstaunlicherweise konnten Transkripte durch das *Fab7* CMM in beiden Richtungen detektiert werden. Der Nachweis beider *Fab7* RNAs gelang frühestens in Embryonen im Blastulastadium, wobei das unterschiedliche Expressionsmuster auffallend war. Das d-p Transkript wurde in einem schmalen Streifen am posterioren Ende des Embryos exprimiert und teilte sich mit fortschreitender Entwicklung in drei Streifen auf. Es lässt sich keine eindeutige Aussage über die Anzahl der Streifen im Blastulastadium machen. Das als ein Streifen wahrgenommene Expressionsmuster zwischen ca. 14 und 20 % der Embryolänge könnte auch aus zwei bis drei Streifen bestehen, die unterhalb der Auflösungsgrenze liegen (vgl. Pfeile in Abb. 2.2 a). Mit Einsetzen der Keimstreifverlängerung wurde die Auflösung in drei Streifen sichtbar. Jeweils die letzten drei Parasegmente (PS 12-14) exprimierten *Fab7* (Abb. 2.2 b), allerdings waren die Transkripte oftmals nur in den letzten beiden Parasegmenten detektierbar.

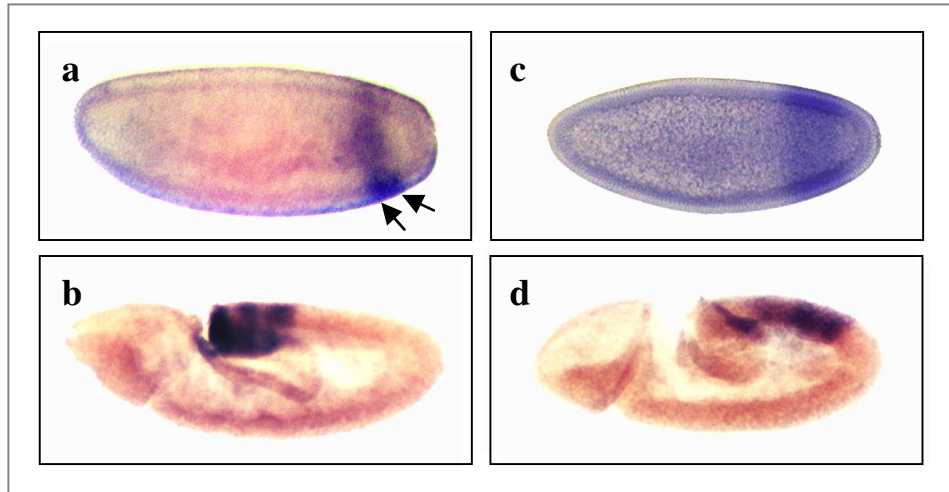


Abb. 2.2: *In situ* Hybridisierung von *Fab7* RNAs in Wt Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien. Im Blastulastadium wird das d-p Transkript posterior in zwei nicht genau zu trennenden Streifen (Pfeile) exprimiert (a). In späteren Stadien erfolgte eine Aufteilung in 3 Streifen in den Parasegmenten 12-14 (b). Das gegenläufige p-d Transkript wurde posterior in einem breiten Streifen exprimiert (c), der sich später in die Parasegmente 11-13 auftrennte (d).

Das Expressionsmuster des p-d Transkripts unterschied sich im Blastulastadium vom d-p Transkript. Die p-d RNA wurde in einem breiterem Bereich, zwischen 12 und 28 % des Embryolänge nachgewiesen (Abb. 2.2 c). Diese Domäne formt im Laufe der Entwicklung die PS 11 bis 13. Sichtbar wurde die Expression in älteren Stadien in den Parasegmenten 11-13 (Abb. 2.2 c). Interessanterweise unterschieden sich die Expressionsmuster der gegenläufigen Transkripte im Stadium der Keimstreifverlängerung auch in ihrer Intensität. Das d-p Transkript, welches die gleiche Orientierung wie die homöotischen Gene des BX-C besitzt, wurde in PS 14 am stärksten transkribiert und schwächt sich weiter anterior bis zum PS 12 ab (Abb. 2.2 b). Das proximal-distale Transkript verhielt sich diesbezüglich umgekehrt. Am stärksten wurde es in PS 11 und am schwächsten in PS 13 exprimiert (Abb. 2.2 d). Die beiden Transkripte scheinen somit in gegenläufigen Gradienten exprimiert zu werden.

Für die bislang beschriebenen *in situ* Experimente wurde eine 3,6 kb *Fab7* Sonde der entsprechenden 5'-3' Orientierung verwendet. Um zu klären, wie weit sich die tatsächlich transkribierten RNAs überschneiden und ob sie sich nur auf das 3,6 kb CMM beschränken, wurde mit 1 kb Sonden dieser und benachbarter Regionen gearbeitet. Die dafür verwendeten Sonden 4 bis 10 überlappten an ihren Enden (Abb. 2.3). Interessanterweise zeigten *in situ* Hybridisierungen mit unmittelbar angrenzenden Sequenzen, dass die jeweiligen RNAs beider Transkriptionsrichtungen über das 3,6 kb *Fab7* Element hinausreichten. RNAs distal-proximaler Orientierung begannen mindestens innerhalb des 1 kb weiter stromaufwärts gelegenen Abschnitts (Sonde 4) und erreichen somit eine Gesamtlänge von mindestens 7 kb

(bis Sonde 10). Das am meisten proximal gelegene getestete Transkript hybridisierte 3 kb stromabwärts des 3,6 kb *Fab7* CMMs (Sonde 10). Von Hybridisierungen weiterer benachbarter Sequenzen wurde abgesehen, da aus Northern Blots und Primer Extension keine Ergebnisse über die ungefähre Länge des Transkripts gewonnen werden konnten.

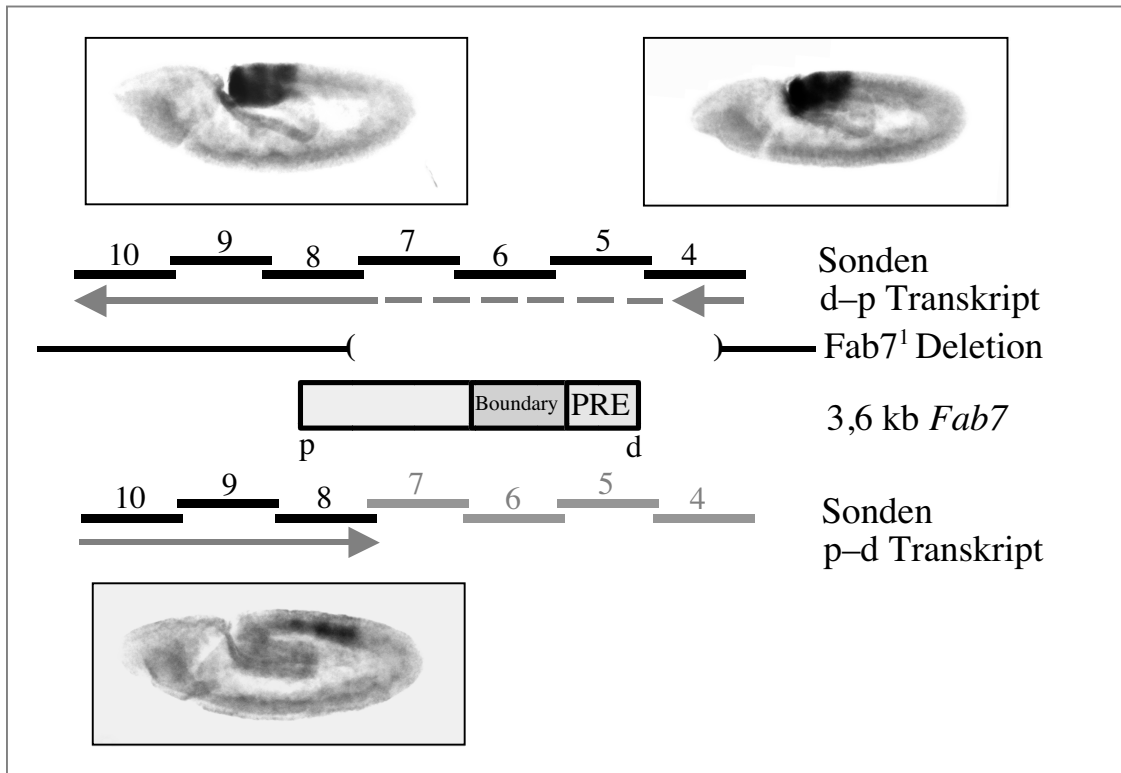


Abb. 2.3: Transkription des *Fab7* CMMs und benachbarter Sequenzen wurde in d-p sowie p-d Orientierung gefunden. Getestete 1 kb RNA Sonden beider Orientierungen: Sonden 4-10. Transkription in d-p Orientierung wurde in den Parasegmenten 12-14 detektiert. Transkripte in p-d Orientierung in den Parasegmenten 11-13. In Wt hybridisierten die Sonden 4 bis 10 ein d-p Transkript, während die p-d RNA nur von den Sonden 10 bis 8 detektiert wurde. Die 4 kb Deletion (*Fab7*¹) des *Fab7* Elements hatte keinen Einfluss auf beide Transkriptionsrichtungen der proximal gelegenen Sequenzen (Sonden 7-4).

Derselbe 7 kb Abschnitt wurde auch auf das gegenläufige Transkript (p-d) und dessen Länge in 1 kb Schritten untersucht. Auch dort nimmt die Transkription ihren Ursprung außerhalb des CMMs (Sonde 10), terminiert jedoch vor dem Boundary Element im proximalen Teil von *Fab7* (Sonde 8). Folglich wird das Boundary Element und das PRE des CMMs nur in d-p, nicht jedoch in p-d Orientierung abgelesen. Die gleichen Experimente wurden auch mit der *Fab7*¹ Linie, die Träger einer 4 kb *Fab7* Deletion ist, durchgeführt. Dabei zeigten die der Deletion benachbarten Sequenzen dasselbe Expressionsmuster wie im Wt Embryo. Das d-p Transkript muss somit im mehr distalen Bereich, außerhalb des CMMs, gestartet werden.

2.1.3 *Cis*-regulatorische Sequenzen des BX-C werden kolinear exprimiert

Lipshitz et al. (1987), sowie Sanchez-Herrero und Akam (1989) konnten bereits von nichtkodierenden RNAs im BX-C berichten. In dieser Arbeit wurde auch anhand des *Fab7* CMMs gezeigt, dass innerhalb des BX-C weitere Transkripte auftraten, die vermutlich regulatorische Aufgaben erfüllen. Die Sequenzen des BX-C bestehen zu 1,4 % aus den kodierenden Regionen für die drei homöotischen Gene, die verbleibenden 89,6 % jedoch bestehen vorwiegend aus *cis*-regulatorischen Elementen, die eine parasegmentspezifische Expression der homöotischen Gene gewährleisten. Ob auch andere regulatorisch wirkende Sequenzen des BX-C transkribiert werden und in welchem Expressionsmuster sie auftreten, wurde mit *in situ* Hybridisierungen ermittelt. Von Interesse waren neben PREs intergenische Abschnitte, die nicht mit kodierenden Bereichen für homöotische Gene überlappten.

Die benutzten Sonden sind in Abb. 2.4 als blaue Kästchen eingezeichnet. Es wurden beide Transkriptionsrichtungen überprüft. Die im BX-C am meisten distal gelegene Sonde 1 ergab in beiden Orientierungen keine Hybridisierungssignale. Die stromaufwärts von *Abd-B* gelegene Sonde 2 hybridisierte in beiden Orientierungen, jedoch nicht im Blastulastadium, sondern nur in älteren Embryonalstadien. Die Expression beschränkte sich auf PS 14. Die weiter proximal gelegene Sonde 3 detektierte nur ein Transkript distal-proximaler Orientierung, welches bereits im Blastulastadium auftrat. Es wird in einem schmalen Streifen zwischen ca. 14 und 20 % der Embryolänge sichtbar und entwickelt in älteren Stadien die gleiche Expressionsdomäne wie *Fab7*. *Fab7* selbst wird in beiden Richtungen transkribiert und zeigt das schon im vorangegangenen Kapitel beschriebene Hybridisierungsmuster. Ein zwischen dem *Fab7* und *MCP* PRE liegender Abschnitt (Sonde 11) wird nur in d-p Orientierung abgelesen und in einem Streifen exprimiert. Dieser entspricht ebenfalls stark dem *Fab7* Muster (Sonde 4 bis 10) in d-p Richtung. Mit der Sonde 12 wurde ein Expressionsdomäne gefunden, die nicht dem des *MCP*, jedoch dem des *Fab7* CMM gleicht. Sonde 12 detektierte einen einzelnen Streifen zwischen 14 und 20 % der Embryolänge. Er ging auf ein Transkript in d-p Orientierung zurück. Verwendet man *MCP* als Hybridisierungssonde, erhält man im Blastulastadium 3 Streifen, in späteren Stadien der Embryonalentwicklung Signale in den PS 10-14 (persönl. Mitteilung M. Prestel). Entlang der d-p Achse des BX-C folgen die Sonden 13 und 14, mit denen keine embryonal exprimierten RNAs nachgewiesen werden konnten. Die nächsten Transkripte ließen sich erst wieder mit einer Sonde in der *iab-4* Region (Sonde 15) hybridisieren. *iab-4* wird für die segmentspezifische Expression des *abd-A* Gens benötigt (Karch et al., 1985). Diese *iab-4 cis*-regulatorische Sequenz wird zwischen 11 und 42 % der Eilänge, also in den Vorläufern der

PS 8-14, in d-p Richtung transkribiert.

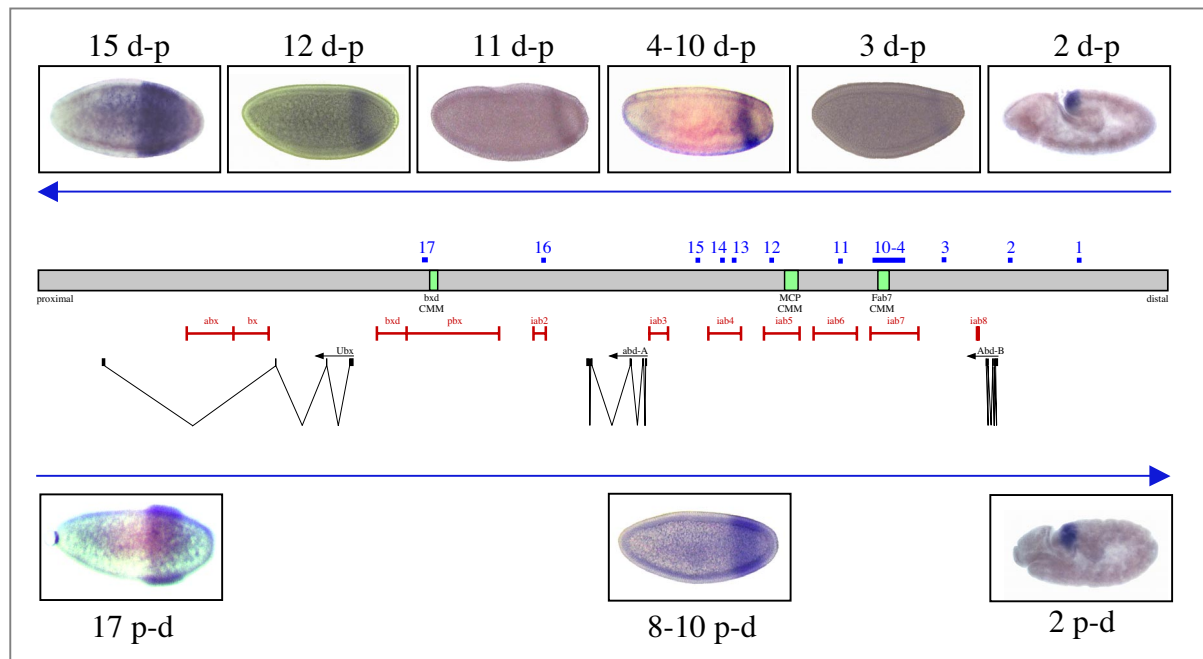


Abb. 2.4: Die Expressionsmuster potentiell regulativer RNAs verhielten sich ähnlich zu den Expressionsdomänen der homöotischen Gene. Sie wurden entlang der posterior-anterioren Achse des Embryos übereinstimmend mit ihrer linearen Anordnung im BX-C Gencluster transkribiert. Die Sonden 2, 3, 4-10, 11, 12 und 15 wiesen Transkripte in d-p Orientierung nach. Für drei Regionen (Sonden 2, 8-10 und 17) wurden Transkripte in entgegengesetzter d-p Richtung gefunden. Die durchnummerierten Kästchen symbolisieren die Position der zur *in situ* Hybridisierung verwendeten Sonden. Die blauen Pfeile geben die jeweilige Orientierung der detektierten RNAs an.

Die mit der *iab-2* Region überlappende Sonde 16 wies keine Transkripte nach. Die letzte und am weitesten proximal gelegene Sonde 17 innerhalb von *pbx* nahe des *bxd* PREs zeigte eine RNA in p-d Orientierung auf. Sie wurde zwischen 18 und 42 % der Eilänge detektiert. Ihre Transkriptionsrichtung ist insofern überraschend, da das *bxd* PRE nur in gegenläufiger d-p Richtung zwischen 25 und 50 % der Eilänge transkribiert wird (persönl. Mitteilung von M. Prestel). Mit Ausnahme von Sonde 12 ergaben die benutzten Sonden ein kolineares Expressionmuster entlang der distal-proximalen Achse des BX-C. Dies traf sowohl für die RNAs in d-p als auch in p-d Orientierung zu. Die mit der Sonde 12 detektierte RNA wird gegenüber dem *MCP* CMM in einer weiter posterior gelegenen und schmalen Domäne exprimiert. Die benutzten Sonden besitzen gemäß der Sequenzanalyse keine nennenswerten offenen Leseraster, was jedoch nicht ausschließt, dass es sich bei den untersuchten Abschnitten um Introns handeln könnte. Da von den gefundenen intergenischen Transkripten keine cDNA zur Verfügung stand oder hergestellt werden konnte, bleibt die Frage offen, ob die Transkripte proteinkodierend sind oder regulierende Aufgaben besitzen.

2.2 *Fab7* RNA Interference (RNAi) verursacht einen Kutikula Phänotyp

Um die Bedeutung der endogenen *Fab7* Transkripte zu überprüfen, wurde *Fab7* dsRNA in Wt Embryonen mikroinjiziert und deren Segmentierung nach Ausbildung der Kutikula analysiert. RNAi ist ein Mechanismus, bei dem das Transkript eines Gens durch Injektion homologer dsRNA reduziert oder vollständig eliminiert wird. In vielen Fällen ähnelt der hervorgerufene Phänotyp einer “Loss-of-Function” Mutation (Montgomery et al., 1998; Kennerdell und Carthew, 1998; Misquitta und Paterson, 1999; Li et al., 2000; Wianny und Zernicka-Goetz, 2000). Der mittels dsRNA verursachte Phänotyp kann hohe Stabilität aufweisen und überdauert in einigen Fällen sogar bis in die nächste Generation (Fire et al., 1998).

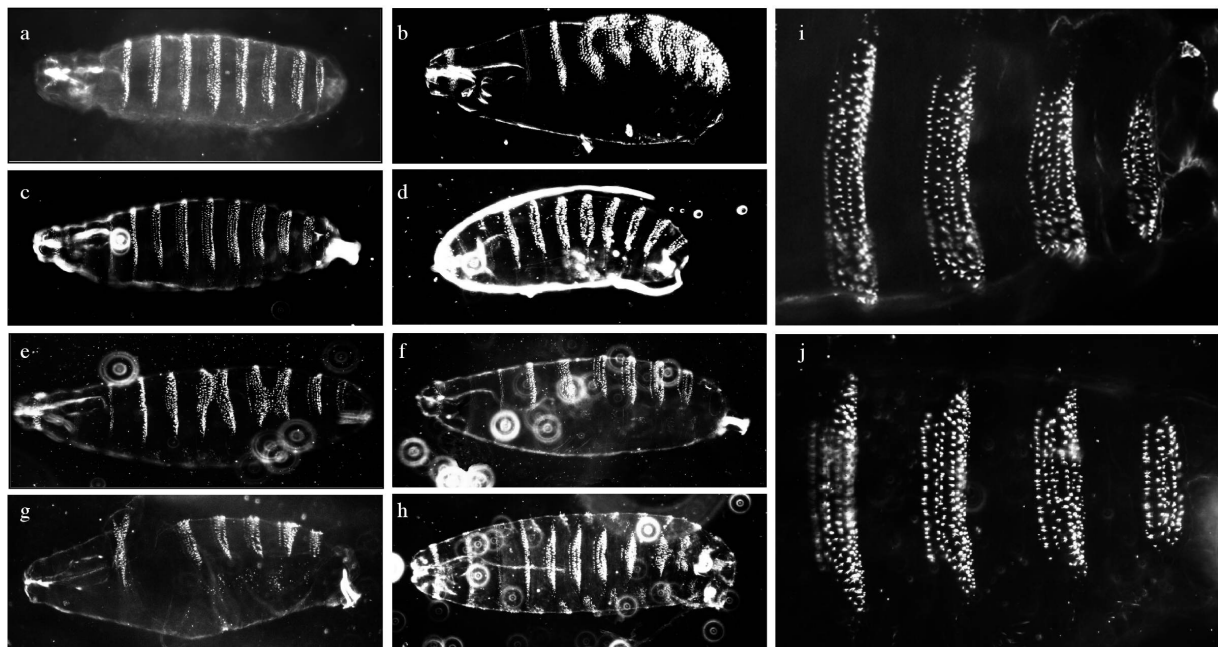


Abb. 2.5: RNAi Experiment. Kutikula Präparationen von 24-48 h alten 1. Instar Larven nach *Fab7* dsRNA Injektion in Blastula Embryonen. **a:** nicht injizierter Wt Embryo. **b:** Injektionskontrolle *wg* dsRNA. **c:** 4 kb Deletion des *Fab7* Elements. **d - h:** Kutikula Phänotypen nach Injektion von *Fab7* dsRNA. Abdominalsegmente A4 bis A7 bei *Fab7*¹ Homozygoten (**i**) und *Fab7* dsRNA injiziertem Wt (**j**).

Sollte die *Fab7* RNA bei der Segmentierung des Embryos als Molekül an sich eine Rolle spielen, wäre bei Injektion von *Fab7* dsRNA möglicherweise ein mit der *Fab7*¹ Deletion vergleichbarer Kutikulaphänotyp zu erwarten gewesen. Die in *Fab7*¹ Homozygoten bekannte 4 kb Deletion (Abb.2.5 c und i) führt zu einer „Gain-of-Function“ Mutation, bei der PS 11 in PS 12 transformiert wird (Gyurkovics et al., 1990). Dabei ist eine posteriore Transformation von A6 nach A7 zu beobachten. Ebenso könnte mittels RNAi ein stärker ausgeprägter Phänotyp verursacht werden, da die genaue Länge des „*Fab7*-Transkripts“ nicht bekannt ist. Die *Fab7* Sequenz stellt möglicherweise nur einen Ausschnitt einer langen RNA dar, die auch benachbarte Regionen von *Fab7* reguliert. Ist diese potentiell sehr lange RNA erst einmal

abgebaut, hat dies weitgehende Konsequenzen, die sich in einem entsprechenden Kutikula-phänotyp äußern können.

Zur Überprüfung der RNAi Experimente und der RNAi Effektivität diente als Kontrolle *wingless* (*wg*) dsRNA. Das Segmentpolaritätsgen *wg* ist bei der Etablierung von Zellidentitäten beteiligt und definiert die Grenzen zwischen den anterioren und posterioren Kompartimenten der Segmente. In *wingless* Mutanten fehlt die nackte Kutikula der thorakalen und abdominalen Segmente und wird durch ungeordnete Zähnchenreihen ersetzt (Bejsovec, 1991). 19 % der *wg* dsRNA injizierten Embryonen zeigten einen erkennbaren *wg* „Loss-of-Function“ Phänotyp (Fig. 2.5 b).

Von zwei verschiedenen Sequenzen des *Fab7* Elements wurde dsRNA hergestellt und in Wt Embryonen im Blastulastadium injiziert. Dabei handelte es sich um ein 870 bp dsRNA Homolog des *Fab7* PREs sowie um eine 200 bp homologe Sequenz des proximalen Endes von *Fab7*. Abb. 2.5 d bis h zeigt Beispiele der hervorgerufenen Kutikula-Phänotypen nach Injektion der 870 bp langen *Fab7* dsRNA. In einem kleinen Anteil wurden homöotische Transformationen festgestellt. Ein Großteil der Embryonen starb noch vor vollständiger Ausbildung der Kutikula. In allen untersuchten Embryonen bzw. 1. Instar Larven variierten diese Fehlbildungen sehr. In einigen Fällen waren mehrere Segmente betroffen. Den Larven in Abb. 2.5 f und g fehlt ein abdominales Segment, vermutlich A7. Es ist schwer ersichtlich, ob es zu einer Fusion zweier Segmente gekommen ist, oder ob ein Segment vollständig fehlte. Der *Fab7*¹ Phänotyp ist im 1. Instar Stadium schwer zu erkennen. Die Form der Wt Zähnchenreihen die zwischen A5 und A6 liegen, d.h. von beiden Segmenten gebildet werden (posterioresA5-anterioresA6; pA5-aA6) bilden eine Mischung aus den Zähnchenreihen pA6-aA7 und pA4-aA5. Im *Fab7*¹ Phänotyp gleicht die pA5-aA6 der pA6-aA7 Reihe.

dsRNA injizierten Embryonen in Abb. 2.5 d und h fehlt kein abdominales Segment, jedoch sind die Zähnchenreihen entlang ihrer ventralen Achse schmaler als im Wt und gleichen sich untereinander recht stark. In einzelnen Fällen konnte auch eine partielle Fusion von Segmenten beobachtet werden. In Abb. 2.5 e sind die Zähnchenreihen aA4 und pA4 sowie aA6 und pA6 nicht korrekt getrennt. Ein weiterer *Fab7* RNAi Phänotyp war die Transformation von pA6-aA7 zu pA5-aA6 (Abb. 2.5 j).

Ein geringer Prozentsatz (2 %) der *Fab7* dsRNA injizierten Tiere, die sich bis zum Adultstadium entwickeln konnten, wiesen eine dorsalen Kutikulaphänotyp auf. Er unterschied sich völlig vom bekannten *Fab7*¹ Phänotyp, bei dem A6 zu A7 transformiert. Dabei sind die Tergiten der Abdominalsegmente 4 und 5, oder 3 und 4 partiell verschmolzen oder nicht geschlossen wie beispielsweise die Tergite 4 und 5 in Abb. 2.6 a und b. Diese Fehl-

bildungen waren nicht vererbbar. Dieser Phänotyp findet sich gelegentlich auch in Wt, liegt aber unter 0,5 %. Bei überlebenden Adulten aus der *wg* dsRNA Injektion, oder auch bei der Herstellung transgener Fliegen, wurde dieser Phänotyp nicht beobachtet. Somit kann eine physikalische, durch die Injektion verursachte Störung ausgeschlossen werden.

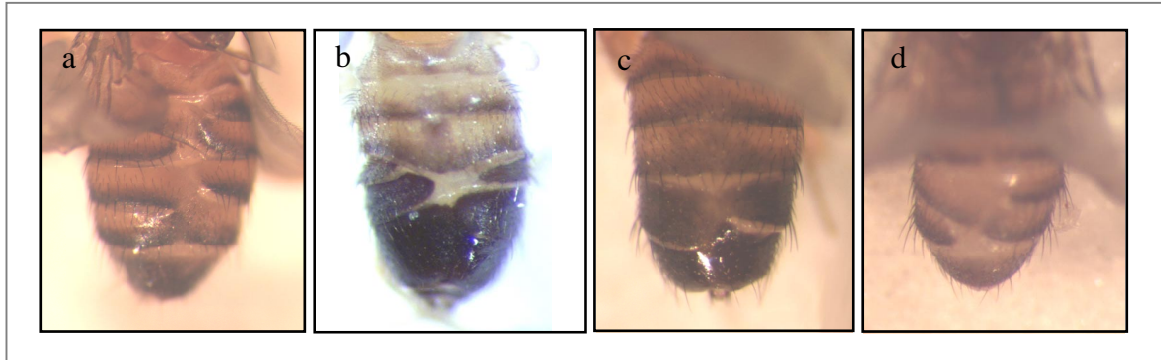


Abb. 2.6: *Fab7* RNAi induzierter Kutikulaphänotyp in einem adulten Wt Weibchen (a) und Männchen (b): Ihre Tergite der Abdominalsegmente vier und fünf sind nicht geschlossen. Ein ähnlicher Phänotyp wurde bei *MCP* dsRNAi (c) und *bxd* RNAi (d) beobachtet.

Fab7 kontrolliert segmentspezifisch *Abd-B* Expression, und in *Fab7^l* Fliegen wird *Abd-B* in PS 11 fehlreguliert (Gyurkovics et al., 1990). Inwiefern die *Fab7* RNA dabei selbst eine Rolle spielt, war die erweiterte Fragestellung des beschriebenen RNAi Experiments. Sollte die *Fab7* RNA an der *Abd-B* Regulation beteiligt sein, wäre entweder der Phänotyp einer *Abd-B* Deletion, oder der einer Überexpression zu erwarten gewesen. Er müßte auch mit dem *Fab7* RNAi Phänotyp vergleichbar sein. Es gibt zwei Isoformen von ABD-B, ein regulatorisches (r) und ein morphogenisches (m) Protein. Vom regulatorischen nimmt man an, daß es das morphogenische suprimiert (Casanova, 1986). *Abd-B* „Loss-of-Function“ Mutationen führen zu anterioren Transformationen der PS 10-14, ektopische Expression von *Abd-B* hingegen reprimiert *Ubx* und *abd-B* und induziert A8-segmenttypische Strukturen in thorakalen und abdominalen Segmenten (Castelli-Gair et al., 1994; Lamka et al. 1992).

Um die RNAi *Fab7* Phänotypen mit einem *Abd-B* RNAi Phänotyp vergleichen zu können, wurde *Abd-B* dsRNA in Wt Embryonen injiziert. Die benutzte dsRNA war dem 3' Ende, der Homöobox aller bekannten *Abd-B* Transkripte, homolog. Injektion von *Abd-B* dsRNA war für die Mehrheit der Embryonen letal. Eine sehr geringe Anzahl zeigte einen Kutikula-Phänotyp, bei dem Abdominalsegment 8 zu Abdominalsegment 7 transformiert wurde (Zähnenreihe aA8-pA7 zu aA7-pA6). Die Anzahl der Segmente blieb stets unverändert. Bei der Mehrheit der Kutikulamutanten wurden jedoch anteriore Transformationen der Abdominalsegmente A5, A6 und A7 nach A4 beobachtet (Abb. 2.7), wie sie von *Abd-B* Allelen bekannt ist. Es handelt sich um einen *Fab7^l* entgegenwirkenden Phänotyp, wie er in

*Fab7*¹ eingekreuzten *Abd-B* Revertanten beobachtet wurde (Gyurkovics et al., 1990). Der von *Fab7* dsRNA verursachte Phänotyp unterschied sich somit vom *Abd-B* RNAi Phänotyp oder ektopischer *Abd-B* Expression. Jedoch kann eine Rolle der *Fab7* RNA zur *Abd-B* Regulation nicht endgültig ausgeschlossen werden. Wird über *Fab7* dsRNA eine sich über viele *cis*-regulatorische Domänen erstreckende RNA abgebaut, könnte dies die beobachteten homöotischen Transformationen verursacht haben, indem nicht nur *Abd-B* sondern zusätzlich auch *abd-A* fehlreguliert wurde.

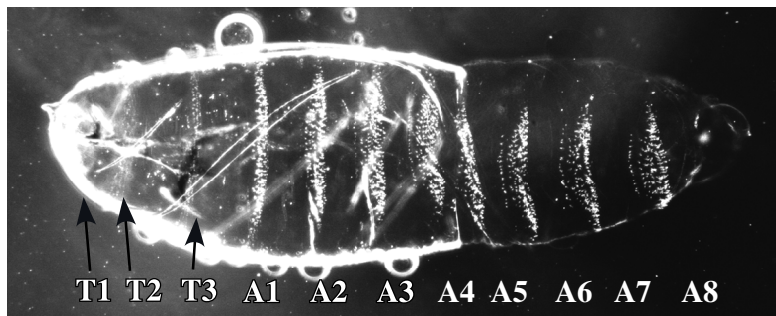


Abb. 2.7: Kutikula eines *Abd-B* dsRNA injizierten Wt Embryos. Anteriore Transformation von A8 nach A7. Auch A7 und A6 ähneln sich und sind nach anterior transformiert.

Neben *Fab7* dsRNA Injektionen wurden auch RNAi Experimente mit Sequenzen weiterer PREs durchgeführt. Der durch dsRNA von *MCP* oder *bxd* verursachte embryonale Kutikulaphänotyp gleicht dem von *Fab7* RNAi, tritt aber nicht so häufig auf. Dorsale Fehlbildungen der Tergiten bei Adulten wurden nur selten beobachtet (vgl. Abb. 2.6 und Tabelle 2.1). Nachstehende Tabelle fasst die RNAi Experimente zusammen.

dsRNA	Injizierte Embryonen	Embryonen mit Phänotyp	tote Embryonen (inkl. Embryonen mit Kutikulaphänotyp)	geschlüpfte 1. Instar Larven	Adulte mit Phänotyp
wg	100 % (402)	19 %	69 %	31 %	0 %
870 bp <i>Fab7</i>	100 % (501)	2,5 %	64 %	36 %	2 %
200 bp <i>Fab7</i>	100 % (490)	0,6 %	46 %	54 %	0 %
<i>MCP</i>	100 % (837)	1 %	40 %	60 %	0,3 %
<i>bxd</i>	100 % (618)	2,1 %	54 %	46 %	0,2 %
<i>Abd-B</i>	100 % (573)	2,2 %	83 %	17 %	0 %

Tabelle 2.1: Zusammenfassung der RNAi Experimente. RNAi wurde durch Mikroinjektion doppelsträngiger RNAs verschiedener PREs oder Kontrollen (*wg* und *Abd-B*) in Wt Embryonen induziert. Die Analyse der Phänotypen erfolgte größtenteils ohne Ablösung der Embryonen vom Klebeband. Die mit einer 870 bp *Fab7* dsRNA injizierten Embryonen starben im Vergleich mit der *wg* dsRNA Injektion zu einem früheren Zeitpunkt, noch vor vollständiger Ausbildung der Kutikula. Bei *MCP*, *bxd* und *Abd-B* dsRNA injizierten Embryonen verhielt es sich ähnlich. Die *wg* dsRNA injizierten Tiere entwickelten sich weiter und bildeten die Kutikula fast immer vollständig aus.

2.3 Transkription des *Fab7* Elements während der Entwicklung

Da sich der, über *Fab7* stabil vererbare, aktivierte Zustand der *lacZ* und *mini-white* Reportergene bis zum Adultstadium aufrechterhalten lässt, war die Frage, ob auch das CMM Element während der gesamten Entwicklung transkribiert wird. Neben Embryonen wurde nun auch versucht, Transkription des *Fab7* Transgens in älteren Entwicklungsstufen nachzuweisen. Dies geschah anhand von RT-PCRs.

2.3.1 RT-PCR Analyse von *Fab7* RNAs des Embryonalstadiums

Hinweise auf mögliche RNAs des *Fab7* Transgens sollten mittels RT-PCR gewonnen werden. Die FLW-1 Linie trägt auf dem X-Chromosom das p5F24 25,2 Transgen (Abb. 2.8) sowie einen hsGal4 Treiber auf dem 2. Chromosom. Das Umschalten vom reprimierten in den aktivierten Zustand erfolgt durch Hitzeschockung 8-20 h alter Embryonen, die über Nacht bei 18°C abgelegt wurden. Nach diesem Gal4 Puls und einer Ruhephase wurde aus den homogenisierten Embryonen Gesamt-RNA isoliert und revers transkribiert. 1/4 der RT-Reaktion wurden für die PCR eingesetzt. Abb. 2.8 illustriert das p5F24 25,2 Transgen sowie die benutzten Primer.

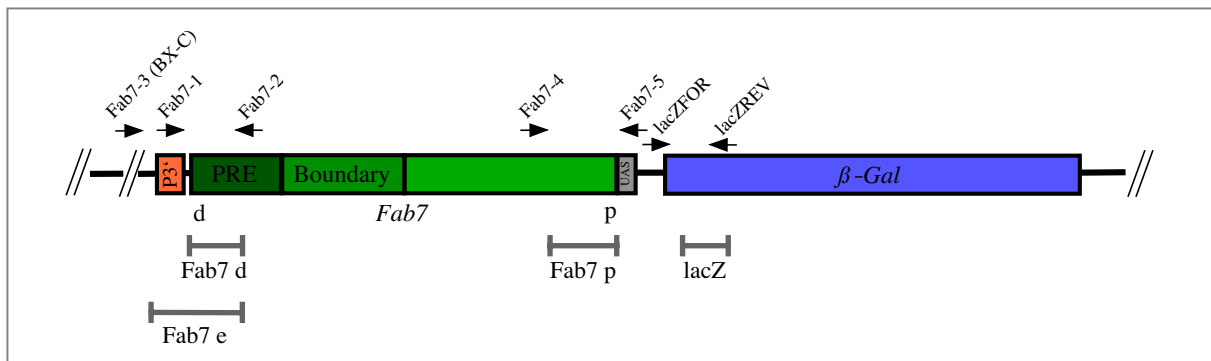


Abb. 2.8: Benutzte Primer für die RT-PCR des *Fab7*-Elements. Die Primer sind nicht massstabsgerecht, jedoch markiert die Pfeilspitze die exakte Position des Primers. Die in RT-PCR verwendeten Primer ergeben folgende Größen: Fab7 d ist spezifisch für Transkripte des exogenen *Fab7* Transgens (p5F24 25,2) (Primerpaar Fab7-1/2): 500 bp. Fab7 e ist spezifisch für endogene *Fab7* Transkript, da der Fab7-3 Primer einem im BX-C benachbarten Abschnitt komplementär ist (Primerpaar Fab7-2/3): 813 bp. Fab7 p ist spezifisch für Transkripte des *Fab7* Transgens (Primerpaar Fab7-4/5): 651 bp. lacZ (Primerpaar LacZFOR/REV): 398 bp

Die interne Kontrolle für den Hitzeschock stellt die Expression des β -Galaktosidase- bzw. *lacZ*-Gens dar. Abb. 2.9 verdeutlicht, dass *lacZ* nach einem einstündigen Hitzeschock in Embryonen exprimiert wird (Abb. 2.9 a). Dass der Hitzeschockpromotor des *Gal4* Treibers auch bei 18°C geringe GAL4 Expression erlaubt und somit in schwacher *lacZ* Transkription

resultierte, ist in Abb. 2.9 b und c. zu sehen. Die genomische DNA wurde vollständig mit DNase verdaut und die reverse Transkription mit oligo dT Primern durchgeführt. Ohne RT Reaktion wurde in der PCR (Abb. 2.9 a: total RNA) keine Amplifikation sichtbar, was Verunreinigung der RT-PCR mit genomischer DNA damit ausschloß.

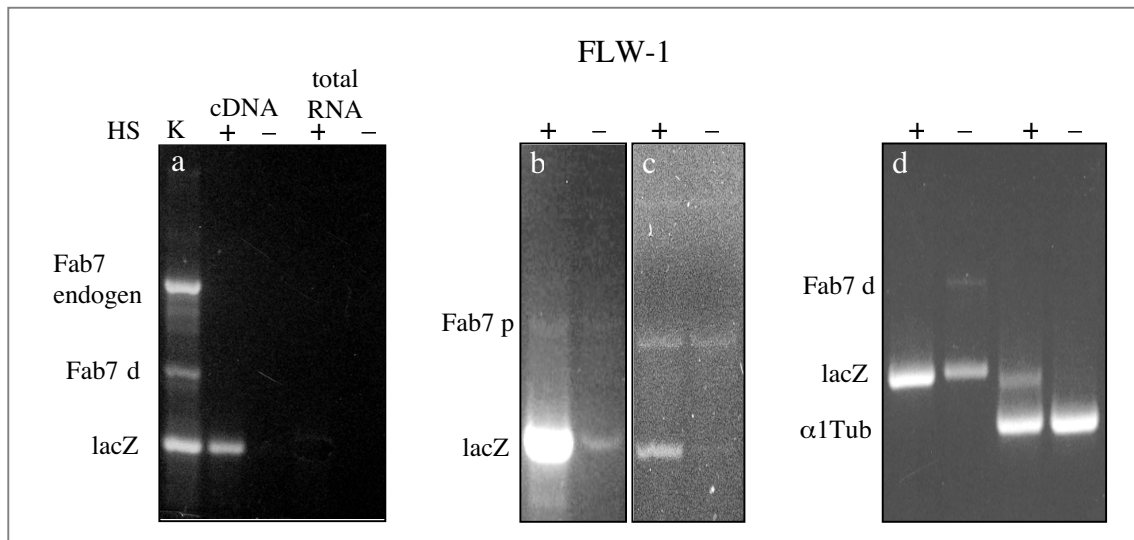


Abb. 2.9 a: RT-PCR von Gesamt RNA aus FLW-1 Embryonen. Ohne RT-Reaktion (total RNA) wurde *lacZ* in der PCR nicht nachgewiesen. Kontrolle der PCR: Plasmide p5F24 25,2 und p4344 gemischt (Spur K). **b** und **c:** *lacZ* Expression in Embryonen nach Hitzeschock. Oligo dT RT-PCR von Gesamt RNA aus 8-20 h alten Embryonen. Die PCR wurde mit einem Primermix aus Fab7-1, Fab7-2, Fab7-3, sowie dem *lacZ* Primerpaar durchgeführt. In **a** und **c** wurde 20 % der RT-PCR auf ein 1,5 % Agarosegel geladen, in **b** 80 %. **b** zeigt schwache Expression im proximalen Teil des *Fab7* Transgens. In **d** wurde Gesamt RNA mit einzelnen Primernpaaren revers transkribiert. Primerpaare für die anschließende PCR entsprachen den in der RT Reaktion eingesetzten. Als zusätzliche Kontrolle wurden α 1Tubulin-For und α 1Tubulin-Rev Primer (α 1Tub) verwendet.

Die für die PCR benutzten Fab7-Primerpaare sind insofern spezifisch für das *Fab7* Transgen, da sie mit Vektorsequenzen überlappen. Eine Ausnahme stellt das Primerpaar Fab7-2/3 dar. Der Primer Fab7-3 ist distal des *Fab7* PREs gelegenen Sequenzen komplementär und könnte in Kombination mit dem Primer Fab7-2 nur die 813 bp Sequenz eines möglichen endogenen *Fab7* Transkripts amplifizieren. Dieses 813 bp Transkript konnte mittels RT-PCR nicht nachgewiesen werden. Daher wurde zunächst vermutet, dass es nicht existiert. Die Primerpaarung Fab7-4 mit Fab7-5 wies schwache Transkription im proximalen Abschnitt des exogenen *Fab7* nach, die jedoch auch ohne Gal4 Puls sichtbar wurde (Abb. 2.9 b und 2.9 c). Gelegentlich konnte auch beobachtet werden, dass trotz Hitzeschockinduktion *Fab7* Transkripte stärker in nicht hitzegeschockten FLW-1 Embryonen exprimiert wurden (Abb. 2.9 d). Das exogene *Fab7* Transkript liegt offensichtlich in nur sehr geringen Mengen vor. Als Referenz für äquimolare Mengen der RT-PCR wurden als weitere Kontrolle α 1Tubulin Primer verwendet. Sie detektierten ein 294 bp großes Fragment des konstitutiv

exprimierten *αTubulin* Gens. Für die in Abb. 2.9 dargestellten RT-PCRs wurde jeweils RNA aus Embryonen der gleichen ÜN-Ablage isoliert. Die *αTubulin* Kontrolle gewährleistete äquimolare Mengen RNA in der RT-PCR und verdeutlicht wie variabel und hitzeschock-unabhängig die *Fab7* Transkripte teilweise sein konnten. Mit der Benutzung von poly dT Primern, oder spezifischen *Fab7* Primerpaaren zur reversen Transkription, konnte nicht festgestellt werden, in welcher Orientierung *Fab7* transkribiert wurde. Setzte man jedoch nur einen spezifischen Primer für die RT Reaktion ein, konnte die Transkriptionsrichtung ermittelt werden.

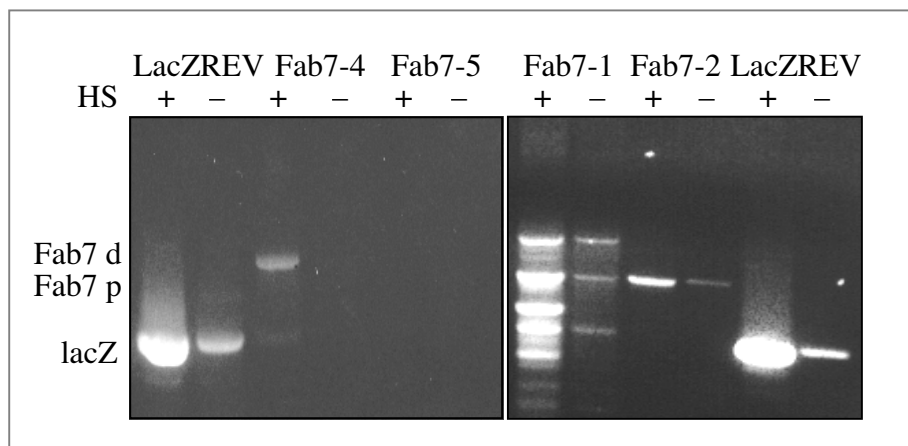


Abb. 2.10: Unidirektionale RT-PCR mit Gesamt-RNA aus FLW-1 Embryonen. 70 % der PCR wurden auf ein 2 % Agarosegel geladen. Die zur reversen Transkription benutzten Primer sind über den Gelspuren angegeben. Die anschließende PCR wurde mit den jeweils entsprechenden Primerpaaren durchgeführt. Der proximale Abschnitt des *Fab7* Elements wurde nach HS in p-d Orientierung transkribiert (Primer Fab7-4 +HS). RNAs im distalen Teil lagen in beiden Richtungen vor, wobei das d-p Transkript (Nachweis durch Primer Fab7-2) auch vom endogenen *Fab7* stammen konnte. Es war auch in nicht hitzegeschockten Embryonen vorhanden (Fab7-2; -HS).

Abb. 2.10 zeigt *Fab7* Transkription innerhalb des PREs. Jedoch scheint *Fab7* in beiden Richtungen transkribiert zu werden, da sowohl der Primer Fab7-1, als auch der Primer Fab7-2 in der RT Reaktion eine cDNA erzeugt. Im Falle dieser unidirektionalen RT-PCR sind allerdings nur der Fab7-1 und der Fab7-5 Primer spezifisch für das exogene *Fab7*, wobei die Primer Fab7-2 und Fab7-4 auch mögliche Transkripte des endogenen *Fab7* Elements detektieren könnten. Mit Fab7-4 konnte ein von proximal nach distal verlaufendes *Fab7* Transkript nachgewiesen werden. Da es abhängig von Gal4 war, stellte es mit großer Wahrscheinlichkeit eine vom Transgen abgelesene RNA dar. Mit dem gegensätzlich orientierten Fab7-5 Primer konnte keine RNA nachgewiesen werden. Mit dem Primer Fab7-1 gelang der Nachweis eines exogenen *Fab7* Transkripts, das nach Gal4 Puls vermehrt exprimiert wurde (vgl. +HS und -HS in Abb. 2.10). In nicht hitzegeschockten Embryonen

ging dessen Expression vermutlich, wie bei *lacZ*, auf die geringe Expression des GAL4 Proteins zurück, da dies unter der Kontrolle eines Hitzeschockpromoters steht. Es ist zu beachten, dass 70 % der PCR auf das Gel geladen werden mussten, um die *Fab7* RNAs nachzuweisen. Bei den multiplen Banden (größer und kleiner als 500 bp) im PCR Ansatz von *Fab7*-1 handelt es sich daher um unspezifische Signale. Wie schon in Abb. 2.9 sichtbar wurde, sind die *Fab7* Transkripte vermutlich nur in geringen Konzentrationen vorhanden, da ihr Nachweis sich als schwierig erwies.

2.3.2 RT-PCR von larvaler *Fab7* RNA

Um die Präsenz der embryonal induzierten *Fab7* Transkripte, oder eine während der Entwicklung anhaltende Transkription in späteren Entwicklungsstadien nachzuweisen, wurde Gesamt RNA aus 3. Instar Larven und Adulten isoliert. Hierfür wurden ausschließlich weibliche Larven herangezogen, da die Aktivierung des *Fab7* Elements in weiblichen Tieren der FLW-1 Linie leichter zu verfolgen ist und Männchen dieser Linie grundsätzlich dereprimiert sind (Cavalli und Paro, 1998). Die Embryonen wurden nach ÜN Ablage hitzegeschockt. Die Hälfte wurde nach 2 Stunden zur RNA Isolation verwendet, während die verbleibenden 50 % in Futterröhrchen überführt und erst nach ihrer Entwicklung zum 3. Instar oder adulten Stadium zur RNA Isolierung herangezogen wurden.

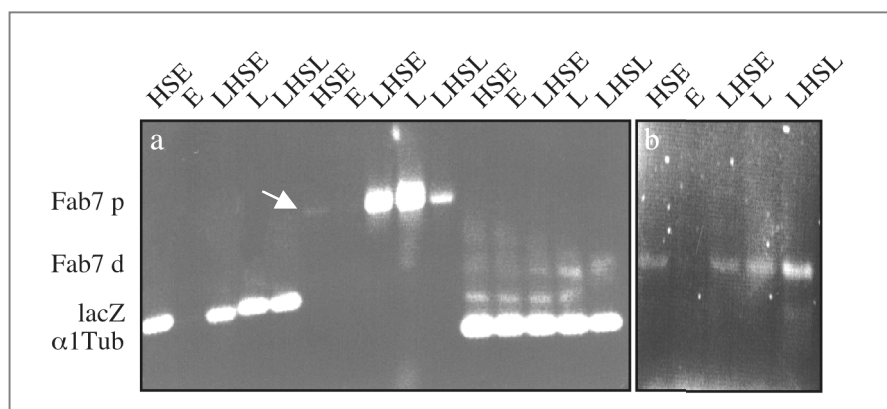


Abb. 2.11: RT-PCR mit Gesamt-RNA aus verschiedenen Stadien der FLW-1 Linie. Die reverse Transkription wurde mit polyA⁺ Primern, und die PCR mit den Primerpaaren *Fab7*-4/5, *LacZ*FOR/REV, α 1TubulinFOR/REV (**a**) sowie *Fab7*-1/2 (**b**) durchgeführt. Nach einer 18°C ÜN Ablage erfolgte der Hitzeschock der Embryonen (HSE) bei 37°C für 1 h gefolgt von einer Ruhephase von 2 h bei 18°C. Kontrollembryonen, bzw. Larven wurden bei 18°C gehalten (E, bzw. L). LHSE: Gesamt-RNA aus 3. Instar-Larven, die als Embryonen hitzegeschockt wurden (wie HSE). Gesamt RNA aus 3. Instarlarven die als Larven hitzegeschockt wurden (LHSL). Der HS erfolgte in einem Eppendorfgefäß für 45 min bei 37°C im Wasserbad gefolgt von 1,5 h Ruhephase. Zur RNA Isolation aus 3. Instar-Stadien wurden ausschließlich weibliche Larven verwendet. Von den PCRs mit *Fab7* Primern wurden 20 % (**a**) bzw. 80 % (**b**) geladen, von den Reaktionen mit α 1TubulinFor und α 1TubulinRev jeweils 2 %.

Der an Embryonen ausgeführte Hitzeschock (HSE) resultierte direkt in Transkription des distalen (500 bp; Primer Fab7-1/2), als auch schwach in Transkription des proximalen (651 bp; Primer Fab7-4/5) *Fab7* Elements. Die *lacZ* Expression in den Embryonen entspricht folglich dem von Cavalli und Paro (1998) publizierten *lacZ* Färbungsmuster. Nach Hitzeschock ist die *lacZ* Expression deutlich nachzuweisen. Bei Betrachtung der Larven, die von hitzegeschockten Embryonen abstammen (LHSE), findet man keinen deutlichen Unterschied zu nicht hitzegeschockten Larven (L). Es hat den Anschein, als ob im 3. Instar Stadium Fab7p mehr oder weniger unabhängig vom Hitzeschock exprimiert wird. Nach dem Hitzeschock im 3. Instar Stadium verringert sich die Expression des proximalen *Fab7* Abschnitts unerwarteterweise (Abb. 2.11 a). Das könnte daran gelegen haben, dass unterschiedlich gut aktivierte bzw. reprimierte Larven benutzt wurden. Unter den 18°C Kontrolltieren tritt immer zu einem geringen Prozentsatz spontane Derepression auf. Allein wenige dereprimierte Larven unter den bei 18°C reprimierten Larven könnten die Ursache für die starke *Fab7p* Expression gewesen sein. Ebenso ist eine Hybridisierung zwischen endogenem *Fab7* „sense“ und exogenem „antisense“ Transkript (siehe auch Kap. 2.1.2) denkbar. Wäre dies der Fall gewesen, hätte so eine Beobachtung allerdings auch im distalen *Fab7* (*Fab7d*) Bereich gemacht werden müssen und konnte daher ausgeschlossen werden.

2.3.3 RT-PCR mit *Fab7* RNA adulter *Drosophila*

In adulten FLW-1 Tieren verhalten sich die *Fab7* Transkripte bezüglich des Gal4 Pulses variabel. Wie im vorangegangenen Abschnitt angedeutet, könnte auch hier die nach dem Gal4 Puls exprimierte p-d RNA dem endogenen Transkript in d-p Richtung entgegenwirken, denn das *Fab7* Transkript konnte oftmals nur in nicht hitzegeschockten Tieren nachgewiesen werden. Auf das Gel in Abb. 2.12 mussten 80 % des PCR Ansatzes geladen werden, um überhaupt Banden erkennen zu können. Hierbei traten in den Spuren mit *α1Tubulin* unspezifische Banden höheren Molekulargewichts auf. RNAs im distalen Bereich des *Fab7* wurden in Adulten nicht gefunden. Am stärksten, bzw. am leichtesten nachzuweisen, waren die *Fab7* Transkripte offensichtlich im 3. Instarstadium. Hier wurde in Adulten *α1Tubulin* aus unerklärlichen Gründen nicht nachgewiesen. Normalerweise wird es, wie in Abb. 2.13 a zu sehen, auch in Adulten exprimiert.

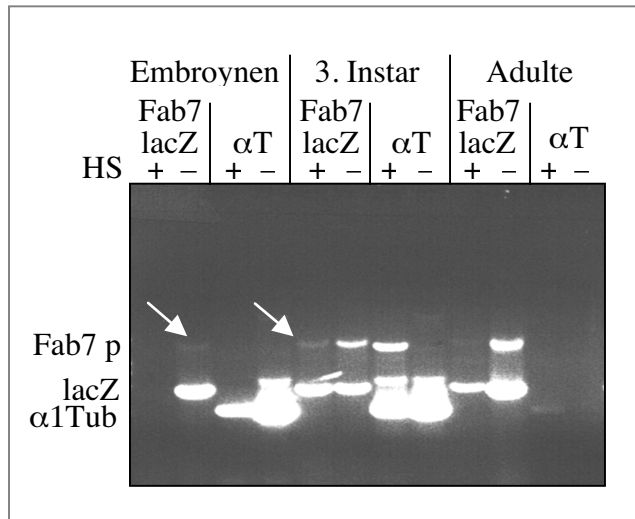


Abb. 2.12: RT-PCR von Gesamt-RNA verschiedener Stadien der Linie FLW-1. Hitzeschock geschah im Embryonalstadium nach ÜN-Ablage (bei 18°C) für 1 h bei 37°C gefolgt von einer Ruhephase für 2 h. Reverse Transkription wurde mittels polyA⁺ Primern durchgeführt, die PCR wie angegeben, mit folgenden spezifischen Fab7 Primerpaaren: Fab7-4 und Fab7-5 (Fab), $\alpha 1$ TubulinFor und $\alpha 1$ TubulinRev (αT), sowie LacZFor und LacZRev (LacZ). 80 % des PCR Ansatzes wurden auf ein 2 % Agarosegel geladen.

Nicht jeder Hitzeschock resultiert zwangsläufig in Dereprimierung und auch nicht jedes Kontrolltier bei 18°C ist gleich reprimiert. Deshalb wurden die Transkripte des exogenen *Fab7* Elements und des benachbarten *lacZ* Reporters in adulten Tieren abhängig vom Grad der erfolgten Dereprimierung nachgewiesen (Abb. 2.13). Die benutzten Adulttiere wurden nach unterschiedlicher Augenfarbe ausgewählt, stammten jedoch von einer ÜN Ablage ab. Die von den hitzegeschockten Embryonen abstammenden Adulten wurden nach ihrer Augenfarbe und Geschlecht getrennt. Nach dem erfolgreichen Umschalten des CMMs in den aktivierten Zustand wurde das *mini-white* Gen stark exprimiert und resultierte in roter Augenfarbe. Dies geschah zu ca. 70 %, und somit befanden sich auch unter den hitzegeschockten Tieren auch helläugige Fliegen (Cavalli und Paro, 1998). Männchen der FLW-1 Linie sind unabhängig von einem Gal4 Puls immer rotäugig, da das p5F24 25,2 Transgen auf dem X-Chromosom inseriert ist. Bei der X-chromosomalen Dosiskompensation in *Drosophila* wird das hemizygot männliche X-Chromosom doppelt so stark wie in Weibchen exprimiert. Dieser übergreifende Mechanismus wirkt sich auch auf das Transgen mit dem *mini-white* Marker aus.

In HS-aktivierten Weibchen (Abb. 2.13, Spur 1) wurde *lacZ* ebenso stark exprimiert wie in rotäugigen Männchen (Spur 3). Bei 18°C gehaltene reprimierte Kontrollweibchen (gelbe Augenfarbe, Spur 2) zeigten, wie helläugige hitzegeschockte Weibchen (Spur 4) vergleichsweise geringe *lacZ* Transkription. Transkripte im proximalen Bereich von *Fab7* (Fab7-4/5) traten unabhängig von Hitzeschock bzw. vom erfolgreichen Umschalten des CMMs auf, da sie in allen Adulten (Fab7-4/5, Spur 1-4) vorhanden waren. Sie scheinen daher vom endogenen *Fab7* zu stammen. Der distale *Fab7* Abschnitt wird deutlich schwächer transkribiert und ist nur nach dem Auftragen von 80 % des PCR Ansatzes sichtbar (Abb. 2.13

b). Hier jedoch zeigt sich eine eindeutige Korrelation zwischen erfolgreicher Aktivierung des CMMs und *Fab7* RNA. Die Fliegen mit roten Augen weisen Transkription auf. Die zweite molekulare höhere Bande geht vermutlich auf unspezifische Amplifikation in der PCR zurück oder möglicherweise auf das Rearrangement des p5F24 25,2 P-Elements (Kapitel 4.3 Abb. 4). Das Auffinden der *Fab7* Transkripte in verschiedenen Entwicklungsstufen der FLW-1 Linie lässt vermuten, dass sie beim Umschalten des *Fab7* CMMs in den aktivierten Zustand oder an dessen Erhaltung beteiligt waren. Wie stabil die exogene und endogene *Fab7* RNA war und welche Abschnitte des PREs in verschiedenen Entwicklungsstadien transkribiert wurden, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher geklärt werden.

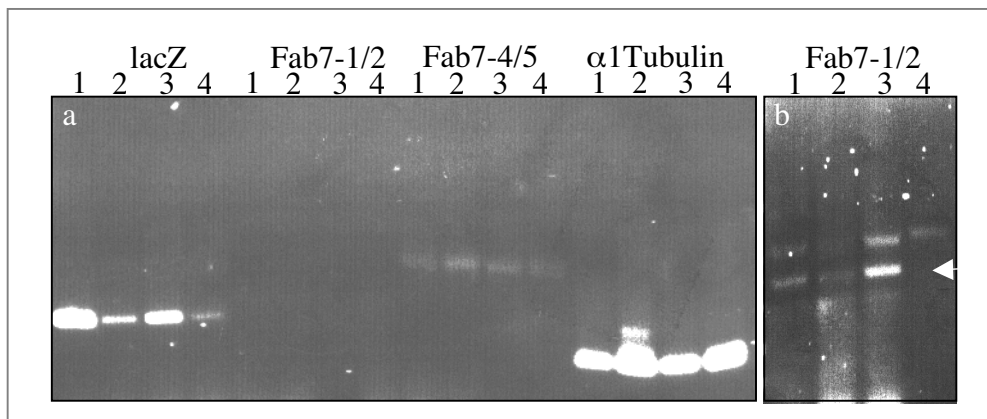


Abb. 2.13 a: RT-PCR von Gesamt RNA aus Adulten der FLW-1 Linie. RT mit poly dT Primern, PCR mit spezifischen Primern wie angegeben. Es wurden jeweils 20 % der PCR geladen. Spur 1: rotäugige Weibchen, die als Embryonen hitzegeschockt (HSE) wurden; 2: helläugige Weibchen (kein HS); 3: rotäugige Männchen (HSE) und 4: helläugige Weibchen (HSE). LacZ wird in hitzegeschockten Tieren stark exprimiert. **b** Die distale *Fab7* Region (Fab7-1/2) wurde nur sehr schwach (80 % der PCR wurde geladen), der proximale Teil etwas stärker transkribiert.

Tabelle 2.2 fasst die anhand der RT-PCR detektierten Transkripte zusammen. Die endogene *Fab7* RNA konnte anhand dieser Technik nicht nachgewiesen werden, da diese Transkripte in sehr geringer Konzentration vorhanden zu sein scheinen. Die Frage bleibt offen, ob die RNAs des *Fab7* Transgens die Entwicklung unversehrt überstanden hatten, oder ob die Transkription dieser Bereiche während der gesamten Entwicklung angehalten hat. Tatsache ist, dass sich auch in älteren Stadien *Fab7* RNAs nachweisen ließen und somit ein Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung des aktivierten Zustandes bestehen könnte.

HSE	Embryonen		3. Instar		adulte Weibchen	
	–	+	–	+	–	+
Fab7 e	–	–	–	–	–	–
Fab7 p	+/-	+	+	+	–	+
Fab7 d	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-
lacZ	+/-	++	+	+	+/-	+
α1Tubulin	+	+	+	+	+	+

Tabelle 2.2: Zusammenfassung der anhand RT-PCR nachgewiesenen *Fab7* Transkripte. Alle untersuchten Entwicklungsstadien wurden im Embryonalstadium hitzegeschockt (HSE). Das endogene *Fab7* (*Fab7 e*) Transkript wurde in keinem Entwicklungsstadium detektiert. Die distalen und proximalen Abschnitte von *Fab7* (*Fab7 d* und *Fab7 p*) wurden grundsätzlich schwach exprimiert und erlauben keine eindeutige ja-nein Antwort. *lacZ* wurde mit Ausnahme des 3. Instarstadiums in Abhängigkeit des Hitzeschocks exprimiert und *α 1Tubulin* konstitutiv.

2.3.4 RNA Analyse embryonaler *Fab7* Transkripte

Nachdem mittels RT-PCR exogene *Fab7* Transkripte festgestellt, jedoch mit dieser Methode keine quantitative Aussage getroffen werden konnte, wurden diese RNAs mittels RNA Blots näher charakterisiert. Zunächst sollte anhand von Northern Blots die Größe der RNA bestimmt werden. Dafür wurden zwischen 3 und 30 μ g Gesamt RNA und auch bis zu 10 μ g polyA⁺ RNA aus Embryonen der FLW-1 Linie geblottet und mit DIG markierten *Fab7* RNA Sonden gegensätzlicher Orientierung hybridisiert. In keinem Fall konnte ein HS-induziertes oder ein endogenes *Fab7* Transkript detektiert werden. Die Vermutung lag nahe, dass es sich bei den *Fab7* Transkripten um sehr lange und begrenzt vorliegende RNAs handelte, oder um sehr kleine *Fab7* RNA-Fragmente, die mit diesem Gelsystem nicht aufzutrennen waren. Es wurde auch intensiv versucht, den Promotor des *Fab7* CMMs mittels Primer Extension zu kartieren. Die reverse Transkription wies unzählige Stopps auf, jedoch kein definiertes 5' Ende. Zwar wurden Primer entlang des gesamten *Fab7* Elements eingesetzt, doch gab es keinen konkreten Anhaltspunkt, wo das 5' Ende lokalisiert sein könnte. Verschiedene Hybridisierungs- und Transkriptionstemperaturen führten nicht zu dem gewünschten Erfolg. Infolgedessen sollten Slot Blots weitere Erkenntnisse bringen. Abb. 2.14 zeigt einen Slot Blot bei dem 5 μ g poly A⁺ RNA und 60 μ g gesamt RNA aus FLW-1/*Fab7*¹, Wt und *Fab7*¹ Embryonen aufgetragen wurden. Der Versuch wurde mit einer FLW-1 Linie durchgeführt, die auf dem 3. Chromosom eine 4 kb Deletion des endogenen *Fab7* im BX-C trägt (FLW-1/*Fab7*¹). Eine Linie mit diesem genetischen Hintergrund diente gleichzeitig als Negativkontrolle (w⁻; *Fab7*¹).

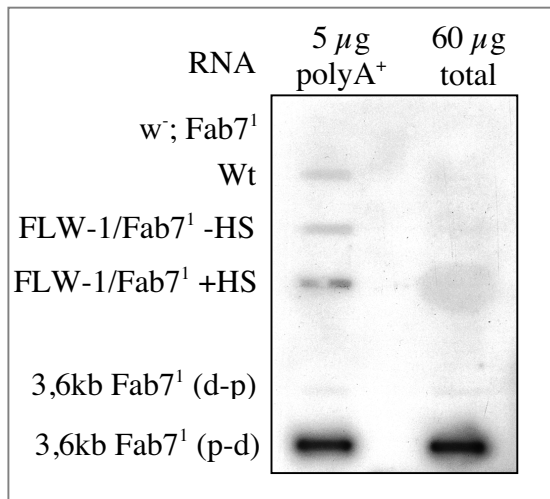


Abb. 2.14: Slot Blot Analyse von poly A⁺ und Gesamt RNA aus Embryonen. Hybridisiert wurde mit einer DIG markierten Fab7 RNA in d-p Orientierung. Zur Kontrolle dienten *in vitro* transkribierte 3,6 kb Fab7 RNAs beider Orientierungen. Die Linie mit einer Fab7^l Deletion diente als Negativkontrolle. Endogene Transkripte in p-d Orientierung wurden auch in Wt polyA⁺ RNA detektiert, in der FLW-1/Fab7^l Linie jedoch zusätzliche transgene Fab7 RNA. Gal4 induzierte FLW-1/Fab7^l Embryonen (+HS) exprimierten diese RNA 2-3 mal stärker als nicht induzierte (-HS).

Offensichtlich handelte es sich bei den *Fab7* Transkripten um polyadenylierte RNAs, denn auch in den RT-PCRs konnten die Transkripte mittels poly dT Primern amplifiziert werden. In den Taschen, in denen Gesamt RNA aufgetragen wurde, konnte keine RNA nachgewiesen werden. Aufgrund technischer Grenzen des Slot Blots (sprich der Viskosität hochkonzentrierter RNA Lösungen) konnte nicht das entsprechende Gesamt RNA Äquivalent von 5 µg poly A⁺ RNA geladen werden. Dies hätte ungefähr 500 µg entsprochen. Die höchste geladene Gesamt RNA Konzentration dieser Versuchsreihe betrug 400 µg und erzielte keine Signale. Zwischen Gal4 induzierten FLW-1 Embryonen (+HS) und Kontrolltieren (-HS) konnte ein Unterschied um den Faktor 2-3 festgestellt werden. Somit war die Transkription des *Fab7* Transgens eine Konsequenz des Gal4 Pulses und der damit verknüpften Aktivierung des CMMs. Eine endogene *Fab7* mRNA wurde mittels der *Fab7* Sonde (d-p Orientierung) in Gesamt RNA aus Wt nachgewiesen. In weiteren Slot Blots konnte keine gegenläufige transgene RNA detektiert werden.

2.4 Charakterisierung des *Fab7* Elements anhand des dualen Gal4 System

2.4.1 Transgenkonstrukte

Die Eigenschaften des p5F24 25,2 Transgens wurden ausführlich von Cavalli und Paro (1998 und 1999) und Zink et al. (1995) beschrieben. Das 3,6 kb große *Fab7* Element wurde als CMM identifiziert und vermittelt den Erhalt aktivierter oder reprimierter Chromatinstrukturen über Zellteilungen hinweg. Das 3,6 kb *Fab7* Element besteht aus einem distal gelegenen Polycomb Response Element, dem PRE, und einem proximal angrenzenden Boundary Element.

Den proximal verbleibenden 1,8 kb konnte bislang keine spezielle Eigenschaft zugeordnet werden. Um die Frage nach dem kleinstmöglichen funktionalen *Fab7* Element zu klären, mussten zunächst Klone mit Subfragmenten hergestellt werden, die letztendlich zur Herstellung transgener Fliegen dienen. Von Interesse war Konstrukte zu klonieren, denen Abschnitte des proximalen *Fab7* Elements fehlen. Als die eigentlichen Zellgedächtnis-vermittelnden Regionen wurden bislang das PRE und das Boundary-Element betrachtet. Inwiefern auf proximale Sequenzen verzichtet werden kann, aber dennoch Zellgedächtnis-vermittelnde Eigenschaften vorliegen, wurde durch die Herstellung folgender Klone getestet:

Im Gegensatz zum p5F24 25,2 Konstrukt der FLW-1 Linie, welche *Fab7* im pU/I5 Vektor, einem pUAST Derivat trägt, wurde in dieser Arbeit der pUZ Vektor (Lyko et al. 1997) verwendet. Der pUZ Vektor geht ebenfalls auf pU/I5 zurück, trägt aber einen zusätzlichen *Not1/Spe1* Polylinker.

Aus dem pHE12 Klon wurde das 1,8 kb *Fab7* (p-d Orientierung) PRE und Boundary über *Not1* herausgeschnitten und in die *Not1* Schnittstelle von pUZ ligiert. Die entstandenen Klone heißen pGR1 bzw. pGR2. Für die Subklonierung des 870 bp großen *Fab7* PREs in pUZ wurde das PRE aus pHE10 mit *Not1* herausgeschnitten und in die *Not1* Schnittstelle des pUZ Vektors ligiert. Je nach Orientierung wurden sie als pGR3 und pGR4 bezeichnet (siehe Abb. 2.15).

Für die Herstellung einzelsträngiger *Fab7* RNA mittels *in vitro* Transkription war es zusätzlich notwendig, das 3,6 kb *Fab7* Element aus p5F24 25,2 über *HindIII* zu isolieren und in den Bluescriptvektor pBS SK- zu klonieren. Die entstandenen Plasmide enthalten das 3,6 kb *Fab7* Fragment in d-p (pBS SK-/3,6Fab7#5) bzw. in p-d Orientierung (pBS SK-/3,6Fab7#6).

2.4.2 Transgene Fliegenlinien

Durch P-Element vermittelte Keimbahntransformation (Spradling und Rubin, 1982; Rubin und Spradling, 1982) erfolgte die Herstellung transgener *Drosophila melanogaster*. Dabei wurden die, im vorangegangenen Kapitel beschriebenen, pUZ Klone mit *Fab7* Subfragmenten mit dem Transposase-kodierenden Helfer-Vektor pUCHs π Δ 2-3 in den posterioren Pol von w¹¹¹⁸ Embryonen koinjiziert. Der zur Injektion verwendete Fliegenstamm w¹¹¹⁸ trägt eine Mutation des *white*-Gens und entwickelt deshalb statt roter Augen nur unpigmentierte weiße Augen.

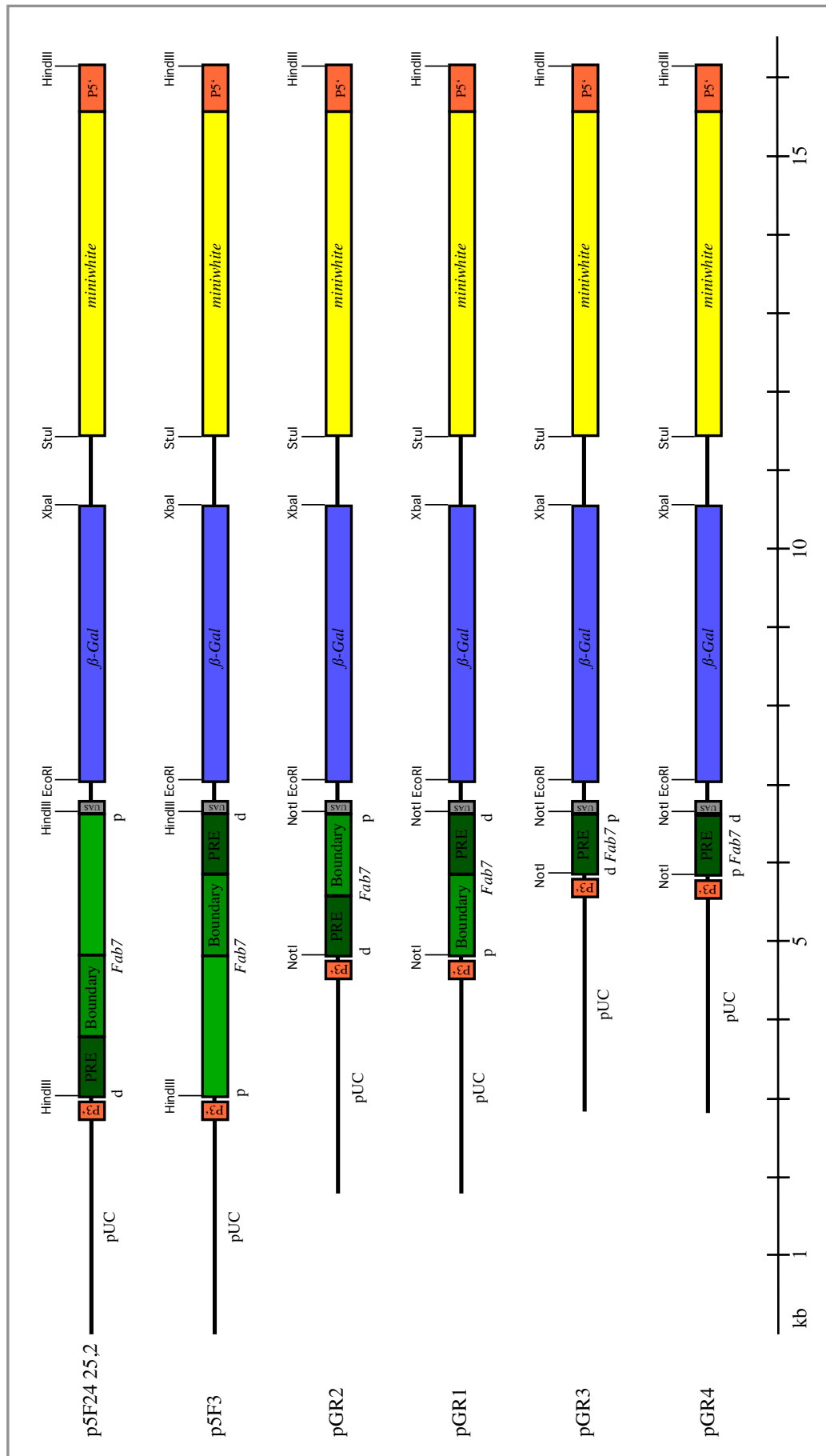


Abb. 2.15: Die Konstrukte p5F24 25,2 und p5F3 tragen das 3,6 kb *Fab7* Element in d-p bzw. p-d Orientierung. Den pGR Konstrukten fehlen entweder 1,8 kb (pGR1 und 2), oder 2,7 kb des proximalen Bereichs (pGR3 und 4). Alle pGR Transformationsvektoren eignen sich zur P-Element vermittelten Keimbahntransformation.

Der verwendete pUZ Vektor ist mit dem mini-*white* Markergen ausgestattet und erlaubt so die Erkennung transformanter Fliegen anhand pigmentierter Augen. Da es sich bei den injizierten Konstrukten um starke Silencer handelte, variierte die Augenfarbe der Transformanten sehr stark, d.h. von rot bis hin zu stark reprimierter Augenfarbe. Oftmals waren nur wenige Omatidien gefärbt. Die Transformationseffizienz betrug zwischen 5 und 12 %, könnte im Falle einzelner vollständiger mini-*white* Reprimierung sogar höher gewesen sein.

Konstrukt	Anzahl der Linien	Kommentar
pGR1	17	9 Transgene auf Chr. II 5 Transgene auf Chr. III 3 Transgene auf Chr. X
pGR2	24	9 Transgene auf Chr. II 7 Transgene auf Chr. III 5 Transgene auf Chr. X Rest nicht kartiert
pGR3	17	4 Transgene auf Chr. II 7 Transgene auf Chr. III 3 Transgene auf Chr. X Rest nicht kartiert
pGR4	9	1 Transgene auf Chr. II 3 Transgene auf Chr. III 4 Transgene auf Chr. X Rest nicht kartiert

Tabelle 2.3: Liste und Kartierung der transgenen Fliegen. Nicht alle der angeführten Linien wurden kartiert oder wurden für diese Arbeit verwendet.

Obenstehende Tabelle fasst die während dieser Arbeit hergestellten transgenen Linien zusammen. Nicht alle Linien wurden kartiert. Eine detaillierte Auflistung findet sich in Kap. 4.3. 15-20 % der Transformanten waren homozygot letal und wurden daher verworfen. Die etablierten Linien wurden anhand geeigneter Restriktionsverdau und eines Southern Blots auf die Kopienanzahl des integrierten P-Elements überprüft. Fliegen mit multiplen Integrationen wurden nicht verwendet.

Bei Betrachtung der Transgenen aller 4 Konstrukte fällt auf, dass ein relativ hoher Prozentsatz einen variegierenden Augenphänotyp aufweist. Die Subfragmente des *Fab7* Elements reichen offensichtlich aus, um das mini-*white* Gen partiell zu reprimieren. In einigen Linien wurde der variegierende Augenphänotyp erst im homozygoten Zustand des P-Element beobachtet und scheint somit „Pairing“-sensitiver Reprimierung zu unterliegen. Die

Reprimierung ist dabei abhängig von zwei Kopien des P-Elements (Kassis, 1991). Zur Expression der Transgene wurde auch hier das duale GAL4-System verwendet (siehe Abb. 1.2). Das in dieser Arbeit anfangs verwendete Treiberkonstrukt liegt auf dem Chromosom II und trägt ebenfalls ein *mini-white* Markergen. Zu einem späteren Zeitpunkt stand ein weiterer *Gal4*-Treiber zur Verfügung, der jedoch auf das *CyO* Balancerchromosom rekombiniert und dessen *mini-white* Gen mutiert wurde (M. Prestel). Dieses Treiberkonstrukt ermöglicht es, die Augenfarbe des zu aktivierenden Konstrukts ohne Hintergrundstörung durch das *mini-white* Gen auf dem Treiberkonstrukt zu betrachten. Transgenlinien mit P-Element Integration auf den Chromosomen X oder III wurden nach geeigneter *mini-white* Reprimierung ausgewählt und mit der Linie des *Gal4* Treiberkonstrukts stabil verkreuzt. Befand sich das P-Element auf dem X Chromosom, wurde in einigen Fällen auch eine *Fab7*¹ Deletion hineingekreuzt. Grundsätzlich wurden die Fliegen bei 25°C gehalten, um eine reprimierte Augenfarbe zu garantieren, da Polycomb Reprimierung bei höheren Temperaturen stärker wirkt.

2.4.3 GAL4 vermittelte Aktivierung der *Fab7* Transgene

2.4.3.1 *lacZ* Färbung von Embryonen und larvalen Speicheldrüsen

Infolge der *hs-Gal47-1(II)* gesteuerten Expression des *LacZ* Reportergens konnten in Embryonen einer ÜN Ablage, die in nachstehender Tabelle (Tab. 2.4) beschriebenen, Blaufärbungsgrade beobachtet werden. Die für den *Gal4* Treiber oder den *CyO* Balancer homozygoten Tiere sterben während der Embryonalentwicklung. Dabei ist es dennoch möglich, dass die für *Gal4* Homozygoten anfangs noch *GAL4* exprimieren und sich anfärben lassen.

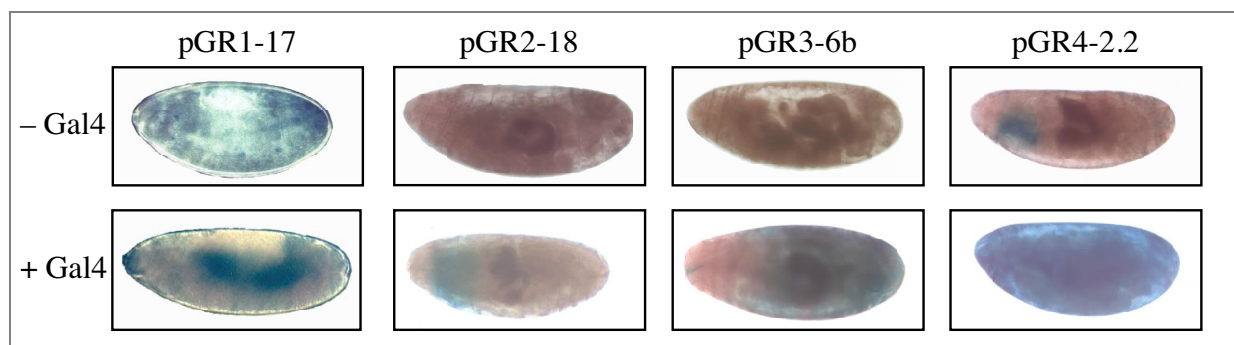


Abb. 2.16: *lacZ* Färbung von Embryonen mit transgenen *Fab7* Konstrukten. Alle Linien tragen den *w⁺ hsGal4CyO* Treiber. Nicht hitzegeschockte Embryonen zeigen keine oder nur variegierende *lacZ* Expression. Nach *Gal4* Expression wird *lacZ* stärker exprimiert, jedoch bleibt das Muster in den gezeigten Embryonen stets variegierend.

Transgen Linie & Gal4 Treiber	Hitze-schock	starke homogene Färbung	mäßige homogene Färbung	variegierende <i>lacZ</i> Färbung	keine Färbung
pGR1-1a;	–			0,5 % (3)	99 % (>200)
w ^{hs} Gal4CyO	+			42 % (55)	58 % (71)
pGR1-17;	–		4,5 % (12)	0,5 % (1)	95 % (>250)
hsGal4	+	19 % (16)		61 % (53)	20 % (17)
pGR2-6a;	–				100 % (72)
hsGal4	+	44 % (48)		11 % (12)	44 % (48)
pGR2-8;	–			20 % (23)	80 % (92)
hsGal4	+	24 % (29)	33 % (40)	22 % (27)	21 % (26)
pGR2-16;	–			49 % (105)	50,5 % (107)
hsGal4	+	37 % (49)	16 % (21)	20 % (27)	27 % (36)
pGR2-18	–				100 % (200)
hsGal4	+			13 % (32)	87 % (211)
pGR3-6b	–			1 % (2)	99 % (130)
w ^{hs} Gal4CyO	+			28 % (71)	72 % (184)
pGR3-19a;	–			14 % (20)	86 % (122)
hsGal4	+	16 % (17)		54 % (60)	30 % (28)
pGR4-2.2;	–			61 % (55)	38 % (34)
w ^{hs} Gal4CyO	+	57 % (50)		15 % (13)	28 % (24)
pGR4-3.7;	–				100 % (115)
w ^{hs} Gal4CyO	+			49 % (61)	51 % (64)

Tabelle 2.4: *lacZ* Färbung von ÜN Ablagen der Linien pGR1 bis pGR4. Hitzeschock für 1 h bei 37°C, Ruhephase für 1 h. Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der tatsächlichen Anzahl Embryonen.

In fast allen untersuchten Linien lässt sich nach einem Hitzeschock eine variegierende bis starke *lacZ* Expression feststellen. Sie erreicht aber mit Ausnahme der Linien pGR4-2.2 und pGR2-6a selten annähernde Werte wie in der FLW-1 Linie, wo der Anteil der homogen gefärbten Embryonen nach Hitzeschock ca. 70 % beträgt (Cavalli und Paro, 1998). Abbildung

2.16 zeigt Linien für jedes Konstrukt. Es ist zu beachten, dass sich die *lacZ* Expressionsmuster in den Linien desselben Konstrukts unterschiedlich darstellen.

Zur Untersuchung, inwiefern sich die GAL4 vermittelte Induktion des *lacZ* Gens in der fortschreitenden Entwicklung aufrechterhält, wurden Speicheldrüsen aus 3. Instar Larven isoliert und *lacZ* gefärbt. Meist spiegelte sich der in den Embryonen beobachtete Färbungsgrad auch in den Speicheldrüsen wider. Linie pGR4-3.5/w^{hs}Gal4CyO beispielsweise, zeigte stark variegierende *lacZ* Expression der Embryonen und auch der Speicheldrüsen nach Hitzeschock. Die Linie pGR4-2.2/w^{hs}Gal4CyO exprimierte *lacZ* in den Speicheldrüsen auch ohne Gal4 Puls äußerst stark, was gelegentlich schon im späten Embryonalstadium beobachtet werden kann (vgl. Abb. 2.16). Die *Fab7* Fragmente konnten offenbar das reprimierte Expressionsmuster des *lacZ* Reporters erhalten, jedoch nicht verändern. Das *lacZ* Expressionsmuster der Speicheldrüsen wurde nur in wenigen Linien untersucht, da die Aktivierung der Reportergene bereits anhand der mini-*white* Expression im adulten Auge analysiert wurde.

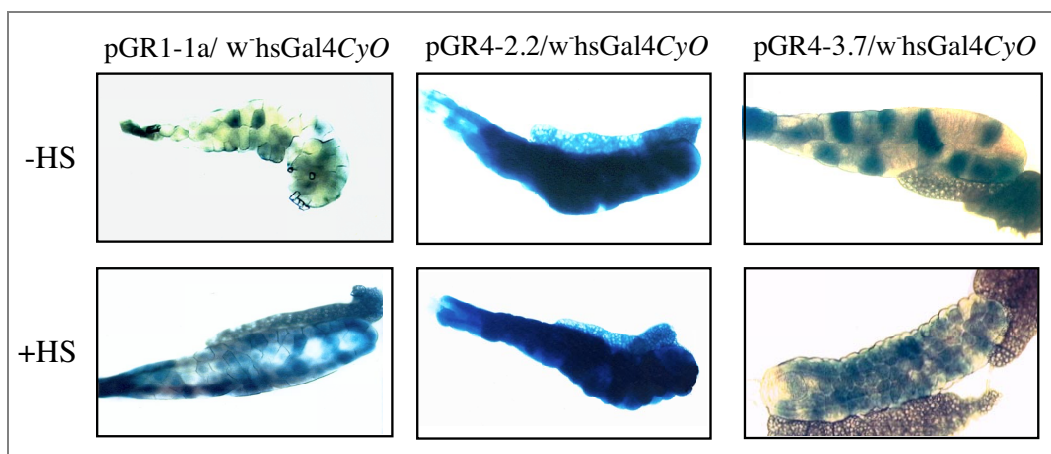


Abb. 2.17: *lacZ* Färbung von Speicheldrüsen aus Larven im 3. Instarstadium. Der Gal4 Puls wurde im späten Embryonalstadium durchgeführt. Die Speicheldrüsen Gal4-induzierter Tiere unterschieden sich von denen nicht induzierter unwesentlich. pGR1-1a/hsGal4 und pGR4/3.7;w^{hs}Gal4CyO exprimieren *lacZ* variegierend, pGR4/2.2;w^{hs}Gal4CyO homogen.

2.4.3.2 mini-*white* Expression der *Fab7* Transgenkonstrukte

In der FLW-1 Linie bleibt der im Embryonalstadium aktivierte Zustand der Reportergene über die gesamte Entwicklung bis zur Adultstadium erhalten (Cavalli und Paro 1998). Im Embryonalstadium hitzegeschockte FLW-1 Fliegen haben aufgrund ihrer mini-*white* Expression rote Augen. In dieser Linie ist diese Vererbung des aktivierten Zustandes des Transgens abhängig vom stromaufwärts gelegenen 3,6 kb großen *Fab7* Element. Ob sich dieser epigenetische Zustand auch durch die verkürzten *Fab7* Elemente vermitteln lässt, wurde mit einigen Linien der pGR1 bis pGR4 Konstrukte getestet.

Abb. 2.18 rechts, zeigt jeweils Fliegenköpfe von Weibchen, die als Embryonen hitzegechockt wurden (+HSE) und sich anschließend bei 18°C zu Adulten entwickelten. In der linken Spalte sind Abbildungen der Referenzfliegen, die über die gesamte Entwicklung hinweg bei 18°C gehalten wurden (-HSE). Als Positivkontrolle dienten zwei Linien mit dem 3,6 kb *Fab7* Konstrukt (FLW-1/*Fab7*¹ und fLW-1/*Fab7*¹) (Abb. 2.18 a). Anhand der *mini-white* Expression in diesen Linien konnte festgestellt werden, wie effektiv die Hitzeschock-Gal4 Induktion war.

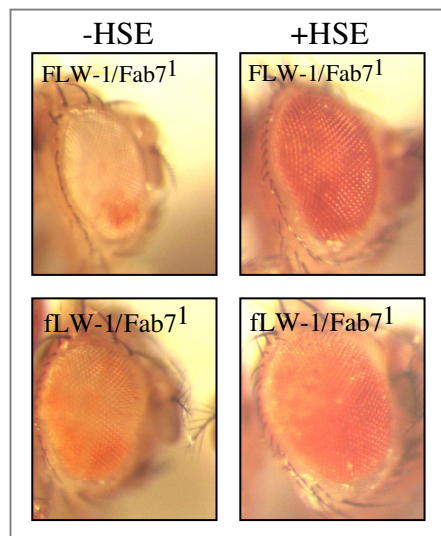


Abb. 2.18 a: Hitzeschock GAL4 induzierte *mini-white* Expression in FLW-1/*Fab7*¹ und fLW-1/*Fab7*¹ Fliegenweibchen. Beide Linien exprimieren *mini-white* nach dem embryonalen Gal4 Puls sehr stark, zeigen bei 18°C aber variegierende Augenfarbe.

Die Auswertung aller Linien mit kürzeren *Fab7* Konstrukten (pGR1 - pGR4) ergab folgendes Resultat: Nach dem transienten Gal4 Puls konnte der aktivierte Zustand nicht über die Entwicklung bestehen. Unabhängig von der Orientierung des *Fab7* Fragments zum *mini-white* Reporter, zeigte keine der Linien dereprimierte Augen. Die Größe der *Fab7* Subfragmente spielte dabei keine Rolle. Die Intensität der Augenfarbe glich den Kontrollfliegen bei 18°C und war gelblich-orange oder stark variegierend. Allerdings wurde in einigen Linien ein dorsaler Kutikulaphänotyp beobachtet, der jedoch durch den Hitzeschock an sich verursacht wurde. Eine entsprechende Kontrolle wurde mit Wt durchgeführt und belegte, dass bei 1-15 Stunden alten Embryonen, nach einem 60 min Hitzeschock bei 37°C, bis zu 40 % der Adulten diese Missbildungen aufwiesen. Der Phänotyp gleicht dem der in Abb. 2.6 durch RNAi hervorgerufenen abdominalen Fehlbildungen.

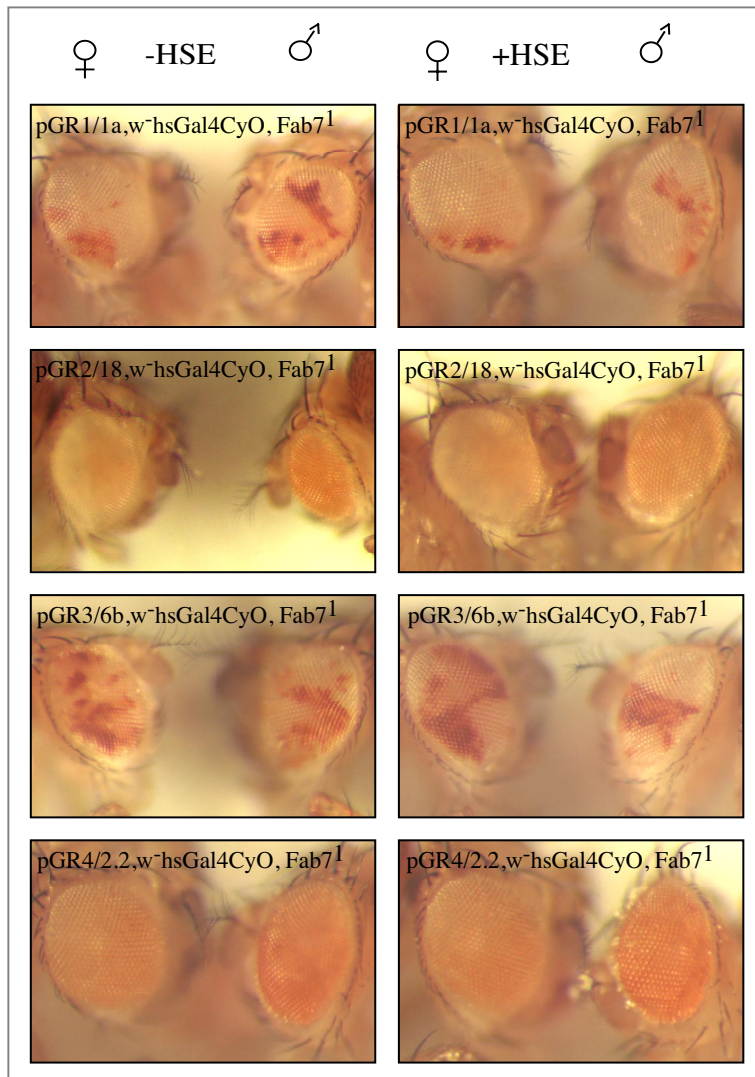


Abb. 2.18 b: Im Embryonalstadium hitzegeschockte Linien mit transgenen *Fab7* Fragmenten zeigen keine mini-white Expression im adulten Auge. pGR1/1a und pGR3/6b entwickeln auch nach Hitzeschock nur ein variegierendes mini-white Expressionsmuster, die Linien pGR2/18 und pGR4/2.2 eine Augenfarbe die zwischen gelblich-orange und leicht variegierend liegt. Der jeweils zur linken abgebildete Kopf stammt von einem *Drosophila* Weibchen, der rechte von einem Männchen.

2.4.3.3 Gekürzte transgene *Fab7* Konstrukte werden nicht transkribiert

Da keine der Linien, deren transgenes *Fab7* Element um den proximalen Abschnitt verkürzt wurde, den aktivierten Zustand über die Entwicklung zum Adultstadium aufrechterhalten konnte, wurde untersucht, inwiefern sich dies auf RNA Ebene widerspiegeln würde. Bei den transgenen Linien mit 3,6 kb *Fab7* Konstrukten (Kap. 2.1.1), steht die Transkription durch *Fab7* in engem Zusammenhang mit dem Umschalten des CMMs. Aufgrunddessen wäre es möglich, dass die verkürzten *Fab7* Konstrukte, gemäß ihrer reprimierten *lacZ* und mini-white Expression nicht oder nur unzureichend transkribiert werden. Wäre dies der Fall, würde dies die Signifikanz der Transkripte zur Umschaltung des *Fab7* CMMs unterstreichen. Mittels *in situ* Hybridisierung wurde getestet, ob einzelne Linien der Konstrukte pGR1 bis pGR4 das *Fab7* Transgen nach Gal4 Induktion exprimieren. In keiner der getesteten Linien (pGR1-1a;w

hsGal4CyO, pGR2-1b;w⁻hsGal4CyO, pGR2-17a;w⁻hsGal4CyO, pGR3-17a;w⁻hsGal4CyO, pGR3-19a;w⁻hsGal4CyO und pGR4-3.7;w⁻hsGal4CyO) konnte, außer dem endogenen *Fab7* Signal, ein Signal des Transgens festgestellt werden (vgl. Kap.2.12). Der fehlende proximale *Fab7* Abschnitt trägt offensichtlich die dafür notwendigen Eigenschaften und enthält möglicherweise einen kryptischen Promotor. Ohne diese fehlende proximale Sequenz konnte keine Transkription durch das CMM ausgelöst werden.

3 Diskussion

3.1 Das exogene *Fab7* CMM wird bei seiner Aktivierung transkribiert

Im dualen Gal4 System ist es möglich das transgene *Fab7* CMM vom reprimierten in den aktivierten Zustand umzuschalten und diesen in einer stabilen Weise aufrechtzuerhalten. Bei der Untersuchung daran beteiligter Mechanismen wurde *de novo* Transkription durch das *Fab7* Element nachgewiesen. Eine bisher entdeckte Eigenschaft dieses CMMs sind unterschiedliche Histon-Acetylierungsmuster (Cavalli und Paro 1999). Histonacetylierung wird in vielen Modellsystemen als ein wichtiger Regulator der Transkription angesehen. Auch das während der Embryogenese aktivierte *Fab7* Transgen weist Histon H4 Hyperacetylierung auf. Diese Histonmodifikation scheint aber nicht ursächlich für das Umschalten des CMMs zu sein, da Trichostatin A (TSA) Behandlung embryonaler Primärkulturzellen der FLW-1 Linie keine Folgen auf die *lacZ* Expression hat (persönl. Mitteilung C. Maurange). TSA ist ein Deacetylase Inhibitor und erhöht somit Acetylierung unspezifisch. Der mit dem CMM in Verbindung gestellte Schaltmechanismus scheint daher anderer Natur zu sein und der Histonacetylierung voranzugehen. Parallelen des BX-C zu anderen Gen-Clustern wie beispielsweise dem *β -Globin*-Cluster, in dem nichtkodierende RNAs identifiziert wurden, warf die Frage nach Transkripten *cis*-regulatorischer Sequenzen auf. Auch im BX-C wurden nichtkodierende RNAs identifiziert, jedoch war ihre Aufgabe bisher unklar geblieben (Sanchez-Herrero und Akam 1989).

Nach Hitzeschock-Induktion zum Umschalten des CMMs im Embryonalstadium konnte, mittels RT-PCR, Expression des *Fab7* Transgens durch alle Entwicklungsstufen hinweg gezeigt werden. Im 3. Instarstadium wurde die vom Transgen stammende *Fab7* RNA am stärksten exprimiert. Warum ein Gal4 Puls im Larvalstadium die Konzentration des Transkripts reduziert, liess sich nicht näher bestimmen. Eventuell lenkt ein GAL4 Puls im Larvalstadium die Transkriptionsmaschinerie vermehrt auf die Reportergene, da das CMM in diesem Stadium bereits so stark reprimiert ist, dass es nur noch transient aktiviert werden konnte (Cavalli et al., 1998). Am wahrscheinlichsten aber, handelt es sich aber um Unregelmäßigkeiten der PCR. Diese Versuchsreihe hatte allerdings nicht die Quantifizierung der RNAs zum Ziel, sondern sollte lediglich die Existenz dieser Transkripte untersuchen. Eine Quantifizierung von RNAs war in diesem Rahmen auch nicht möglich, da die geringe Transkriptionsmenge viele Amplifikationsszyklen der PCR benötigte und diese daher dann nicht mehr im linearen Bereich lag.

Überraschenderweise konnte das Transkript in der RT Reaktion neben den spezifischen, auch mit poly dT Primern angereichert werden, obwohl die RNA scheinbar nichtkodierender Natur ist. Ein weitere Auffälligkeit spiegelte sich in der Stabilität der RNA wider: Die exogene *Fab7* RNA liess sich in zahlreichen RT-PCRs unterschiedlich gut amplifizieren, obwohl Kontrollgene wie *α Tubulin* oder *lacZ* reproduzierbar und reichlich exprimiert wurden. Um die PCR-amplifizierte *Fab7* RNA zu analysieren, mussten teilweise bis zu 80 % der Reaktion auf ein Agarosegel geladen werden. Daraus lässt sich folgern, dass Hitzeschock-induzierte exogene *Fab7* Transkripte nur in geringer Menge vorhanden und starken Schwankungen unterworfen waren.

Bestätigt wurde diese Tatsache auch durch die Slot Blot Analyse. Nur außergewöhnlich hohe Konzentrationen polyA⁺ angereicherter RNA enthielten genügend exogene *Fab7* RNA um den Unterschied zwischen aktiviertem und reprimiertem *Fab7* CMM darzustellen. Der Unterschied um den Faktor 2-3 verdeutlicht, wie selten diese Hitzeschock-induzierten *Fab7* RNAs waren. Auch das endogene *Fab7* p-d Transkript im Wt Embryo wurde nur in sehr geringen Mengen exprimiert.

Intensive Bemühungen, die *Fab7* RNA mittels Northern Blot oder Primer Extension näher zu charakterisieren, führten nicht zu dem gewünschten Erfolg. Das könnte einerseits an einer komplizierten Sekundärstruktur der RNA mit zahlreichen „Stem-loops“ gelegen haben, oder andererseits an einer möglicherweise sehr geringen Konzentration, sowie der Größe der RNA. Allem Anschein nach könnte die RNA auch sehr lang gewesen sein und so Northern und Primer Extension Analyse behindert haben. Möglicherweise erschwerte auch dsRNA, gebildet aus endogener und exogener RNA (vgl. Kap. 2.2.2 und Kap. 3.4), die genauere Analyse. Die durch Hitzeschockinduktion bedingten Transkripte belegten eindeutig die proximal-distale Orientierung der vom P-Element stammenden RNA. Die in der Gegenrichtung verlaufenden RNAs gehen auf das endogene *Fab7* Element zurück. Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht geklärt, ob es überhaupt und in welcher Orientierung es endogene *Fab7* Transkripte gibt, da Datenbanken darüber keinen Aufschluss gaben. Aufgrund dessen wurden auch die mittels RT-PCR gefundenen d-p RNAs zunächst als potentiell exogen angesehen. Später wurde die transgene FLW-1/*Fab7*¹ Linie hergestellt, deren endogenes *Fab7* gegen die *Fab7*¹ Deletion herausgekreuzt wurde. Nun konnte das *Fab7* Transgen ohne den Hintergrund des endogenen *Fab7* Elements störungsfrei untersucht werden.

In situ Hybridisierung von *Fab7* RNA in FLW-1/*Fab7*¹ Embryonen, deren CMM durch den Gal4 Puls umgeschaltet wurde, bestätigten das Ergebnis der RT-PCRs. Es war zu erwarten, dass das *Fab7* Expressionsmuster des p-d Transkripts der *lacZ* Färbung in

Embryonen gleichen oder zumindest ähneln würde. Tatsächlich besaßen die Transkripte durch das CMM in beiden Linien mit dem 3,6 kb *Fab7* Element proximal-distale Orientierung und wurden annähernd homogen exprimiert. Das *Fab7* Expressionsmuster vor und nach dem Gal4 Puls glich sozusagen dem *lacZ* Färbungsmuster davor und danach. Die *Fab7* RNA war unabhängig von der Orientierung des CMMs zu den Reportergenen. Im Falle der FLW-1/*Fab7*¹ Linie transkribierte das CMM jedoch stärker im ZNS. Auch das Umschalten dieser Linie vom reprimierten in den aktivierten Modus erwies sich am Ende der Experimente etwas schwieriger, als zu Beginn. Eine Erklärung könnte sein, dass diese FLW-1/*Fab7*¹ Linie über einen längeren Zeitraum (> 1 Jahr) bei 25°C gehalten wurde. PcG abhängiges Silencing ist, bei Temperaturen größer als 18°C, erhöht. Desweiteren ist ein bekanntes Problem bei Fliegen, deren Transgen-Integration die Vitalität beeinflusst, eine schleichende Anhäufung von direkten Modifizierungen und Mutationen des Transgens selbst, oder von indirekt Einfluss nehmenden Suppressoren oder Enhancern. In der Folge erlangen P-Elemente veränderte Eigenschaften. Folglich schienen im ZNS weniger reprimierende Bedingungen als im restlichen Gewebe vorzuliegen.

In der fLW-1/*Fab7*¹ Linie wurden die *Fab7* Transkripte schwächer exprimiert. Diese Beobachtung korreliert mit dem Umschalten des CMMs und der mini-*white* Expression dieser Linie. Im Vergleich zur FLW-1/*Fab7*¹ Linie gestaltet sich die Umschaltung in fLW-1/*Fab7*¹ Embryonen schwieriger und weniger effektiv, denn das reprimierende PRE liegt hier näher an der UAS und den beiden Reportergenen. X-ChIP (Formaldehyd-Crosslinking Chromatin Immunoprecipitation; Orlando und Paro, 1993) Analyse zeigte hohe PcG Affinität unmittelbar am endogenen PRE auf, welche beiderseits über mehrere Kilobasen abnimmt (Strutt et al., 1997; Orlando et al., 1998). Es ist daher denkbar, dass die Reportergene von dem nähergelegenen *Fab7* PRE in der fLW-1/*Fab7*¹ Linie stärker reprimiert werden als vom umgekehrt angeordnetem CMM der FLW-1/*Fab7*¹ Linie. Da die Transkription des *Fab7* CMMs in seinem proximalen Abschnitt zu beginnen scheint (vgl. Kap. 3.1.3), muss in der fLW-1/*Fab7*¹ Linie der UAS Enhancer zuerst das PRE und Boundary Element überwinden, um auf den im proximalen Bereich vermuteten Promoter wirken zu können. Genau jener proximale Abschnitt fehlt auch den transgenen Linien, die in folgenden zwei Kapiteln diskutiert werden.

3.2 Gekürzte *Fab7* Fragmente reprimieren benachbarte Reportergene in transgenen Fliegen

Bei der Herstellung neuer, für das *Fab7* Element transgener Fliegen, wurde deren *Fab7* Sequenz um den 1,8 kb proximalen Abschnitt oder zusätzlich um das Boundary verkürzt. Nach Etablierung homozygoter Fliegen konnte zunächst kein Unterschied zu Tieren mit dem ursprünglichen 3,6 kb Fragment festgestellt werden. Der *lacZ* Reporter blieb bei 18°C durch das benachbarte *Fab7* PRE reprimiert und dieser Zustand setzte sich über die gesamte Entwicklung bis zum Adulttier fort. Die Repression des P-Elements wurde im Adulttier an der mini-*white* Expression gemessen. Auch die kürzeren Fragmente reprimierten mini-*white* größtenteils in Form von „Pairing“-sensitivem Silencing. Da das zur Erhaltung repressorischer Chromatinstrukturen verantwortliche PRE in diesen Linien vorhanden blieb, hatte das Fehlen der proximalen Sequenz keinen weiteren Einfluss auf das Silencing. Die variegierende mini-*white* Expression entwickelten viele Linien unabhängig von der Orientierung des Subfragments. Wie auch im 3,6 kb *Fab7* Ausgangskonstrukt konnte das Boundary in den Konstrukten mit PRE/Boundary Sequenz die benachbarten Reportergene nicht vom PRE abschirmen. Sollten den Boundaries zusätzliche Aufgaben zukommen? Boundaries, bzw. Isolatoren wie der gypsy Isolator können beispielsweise auch als „in *cis*“ stimulierende Enhancer agieren (Chen und Corces, 2001; Wei und Brennan, 2002). Es stellt sich daher die Frage, ob Boundary Elemente nicht auch als Promotoren fungieren könnten. Das *Fab7* Boundary wurde anhand von Deletionsanalysen und Enhancer Blockierungs-Experimenten definiert, doch der Aspekt der Transkription wurde außer Acht gelassen. Das *Fab7* Boundary stellt ohnehin einen Sonderfall dar. Anstatt benachbarte Domänen zu trennen, die unterschiedliche Gene beinhalten, separiert es *cis*-regulatorische Sequenzen, die jeweils unabhängig voneinander mit den Promotoren ihrer Zielgene interagieren (Gyurkovics et al., 1990). Unabhängig vom PRE trennt es unterschiedliche Chromatinstrukturen (Hagstrom et al., 1996).

3.3 Der proximale Abschnitt von *Fab7* wird für das Umschalten des CMMs benötigt

Obwohl die transgenen Linien mit gekürzten *Fab7* Elementen in der Lage waren, Silencing über die Entwicklung aufrechtzuerhalten, unterschieden sie sich funktionell vom *Fab7* 3,6 kb Ausgangskonstrukt. Wie in Kap. 2.4.3 gezeigt, war es nicht möglich, die *Fab7* Subfragmente

mittels eines Gal4 Pulses während der Embryogenese vom reprimierten in den aktivierten Zustand umzuschalten. Die in einigen Linien embryonal induzierbare *lacZ* Expression konnte weder bis ins 3. Instar, noch bis zum Adultstadium aufrechterhalten werden. Adulte wurden anhand ihrer *mini-white* Expression im Auge analysiert. Der vermeintlich entbehrbare, proximale Abschnitt des *Fab7* Elements besitzt offensichtlich essentielle Sequenzen, um das CMM umzuschalten. Es ist ein allgemein bekanntes Merkmal transgener PREs, dass größere PREs besser wirken als „minimale“. Zudem funktionieren PREs am besten, wenn sie mit den regulierenden Elementen ihrer natürlichen Umgebung kombiniert werden (Müller und Bienz, 1991; Chan et al., 1994; Müller, 1995). Die Tatsache, dass in Embryonen mit gekürzten *Fab7* Elementen auch keine Transkripte beobachtet wurden, bestätigt dies und legt nahe, dass sich innerhalb der proximalen 1,8 kb ein kryptischer Promotor befindet. Folglich ist ohne Transkription durch das PRE/Boundary keine Aktivierung des CMMs möglich. Die benachbarten Reportergene konnten zwar vorübergehend exprimiert werden, doch nach dem Zerfall des GAL4 Transaktivators wurden sie durch das PRE erneut reprimiert. Nach dem Gal4 Puls schienen also die gleichen Chromatinstruktur-beeinflussenden Proteine am PRE in Kraft zu treten wie zuvor. Es ist bisher nicht genau geklärt, ob im Embryo Proteine sowohl der PcG, wie der trxB zeitgleich oder sequentiell an ein und dasselbe PRE binden. Ursprünglich haben endogene *Fab7* PREs vorwiegend TRX gebunden. Später, nach ca. 5 Stunden der Embryonalentwicklung geschieht jedoch eine Umstrukturierung zugunsten des PC Proteins (Orlando et al., 1998). Allerdings beschränkt sich die X-ChIP Analyse auf die Gesamtheit aller *Fab7* PREs im Embryo. Homöotische Gene und auch ihre *cis*-regulatorischen Sequenzen müssen jedoch in der Lage sein, segmentspezifisch zu regulieren. Die mittels X-ChIP entdeckte Verteilung Chromatin-regulierender Proteine beruht also auf der Gesamtheit der im Embryo vermutlich unterschiedlich konstituierten PREs.

Immunfärbungen von Polytäanchrosomen von *Fab7*-transgenen Linien zeigten, dass PC auch nach einem embryonalen GAL4 Puls am CMM lokalisiert (Cavalli et al., 1999). Ob der Zustand in Polytäanchrosomen die Proteinkomposition an einem umgeschalteten CMM wiedergibt, ist unklar. Es deutet jedoch an, dass Silencing Komplexe umstrukturiert werden, aber „vor Ort“ verbleiben können, ohne ihre reprimierende Funktion zu erfüllen. Eventuell sind auch sie am Erhalt transkriptionell aktiven Chromatins beteiligt, so wie beispielsweise GAGA, ein Mitglied der trxB, ebenfalls an repressorischen Aufgaben beteiligt zu sein scheint (Hagstrom et al., 1997; Mishra et al., 2001). Eine klare Trennung der gegensätzlichen Aufgaben von PcG und trxB Proteinen scheint diesbezüglich nicht mehr vertretbar zu sein. Das trxB/PcG Gleichgewicht könnte in nur wenigen Segmenten verändert oder umgekehrt vor-

liegen. Betrachtet man das RNA Hybridisierungsmuster des endogenen *Fab7* Elements in Wt Embryonen, wurden segmentspezifische Unterschiede auf Transkriptionsebene deutlich, die sich konsequenterweise auf das Gleichgewicht CMM regulierender Proteine auswirken müssen. In Anbetracht der X-ChIP Daten, wo die Gesamtheit der *Fab7* PREs im Embryo nach 5 h vorwiegend PC gebunden hatte (Orlando et al., 1998), gewinnt auch das *Fab7* Hybridisierungsmuster an Bedeutung. *Fab7* und *Abd-B* werden nur in den PS 12-14, bzw. 10-14 transkribiert, wurden aber in den meisten Segmenten reprimiert und sind mit repressori-schen PcG Komplexen assoziiert.

3.4 Das endogene *Fab7* Element des BX-C wird segmentspezifisch und bidirektional transkribiert

In situ Hybridisierungen und die Entdeckung der endogenen *Fab7* RNAs lieferte den ursprünglichen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Transkription durch das CMM und Chromatin-Umstrukturierung bzw. Aktivierung. RNA Hybridisierungen an Wt Embryonen belegten, dass das endogene *Fab7* im BX-C segmentspezifisch transkribiert wurde. Das auf drei Parasegmente begrenzte Expressionsmuster deutet auf einen streng kontrollierten Mechanismus am CMM hin. Dem *Fab7* Boundary wird die Aufgabe zugeschrieben, die *iab-6* und *iab-7 cis*-regulatorischen Sequenzen zu trennen und so korrekte *Abd-B* Expression zu ermöglichen (Gyurkovics et al., 1990). Interessanterweise zeigten *in situ* Hybridisierungen *Fab7* Transkription in beiden Richtungen, sowohl durch das CMM als auch durch benachbarte Sequenzen. Beide Transkripte treten erstmals im Blastulastadium auf, also genau zu jenem Zeitpunkt, zu dem *Fab7* beginnt die Expression *Abd-B* zu kontrollieren. Die segmentspezifischen Expressionsmuster überlappen dabei nicht vollständig. Die p-d RNA wird hier in einem größeren und weiter anterior reichenden Bereich exprimiert. Bei Embryonen im Stadium der Keimstreifverlängerung hingegen wurden die *Fab7* RNAs in den Parasegmenten 12-14 (d-p RNA) und 11-13 (p-d RNA) gefunden. Bemerkenswerterweise überschneiden sich die gegenläufigen Transkripte nur im proximalen *Fab7* Abschnitt und davon proximal gelegener Nachbarsequenzen, nicht jedoch am PRE. Inwiefern beide Transkripte z.B. über antisense Effekte miteinander interagieren, konnte anhand der *in situ* Hybridisierungsmethode nicht geklärt werden. Möglicherweise gebildete dsRNA ist sehr stabil und nur bei hohen Temperaturen denaturierbar. Andererseits wird dsRNA kodierender Sequenzen durch den RNAi Mechanismus abgebaut und führt auch zur Degradation seiner komplementären

ssRNAs. Somit könnte die Bildung von dsRNA die in Northern und Slot Blots aufgetretenen Schwierigkeiten erklären. Das PRE selbst wird nur in distal-proximaler Orientierung transkribiert. Die Startstelle dieses Transkripts konnte nicht bestimmt werden, liegt aber möglicherweise viele Kilobasen distal des *Fab7* PREs. Vor über 12 Jahren wurde erstmals auf einen ca. 20 kb distal des *Fab7* gelegenen Promotor innerhalb der *iab-7* Region spekuliert, mögliche transkriptionelle Regulationsmechanismen aber nicht weiter untersucht (Gyurkovics et al., 1990). Eine 4 kb Deletion des *Fab7* Elements hatte keine Auswirkung auf die bidirektionalen RNAs beiderseits der Mutation und schließt somit die Funktion des Boundary oder PRE Elements, Transkripte zu terminieren, aus. *Fab7* Deletionen führen allerdings zu einer Fusion der PS 11 und 12, indem der „offene“ Zustand von *iab-6* auf *iab-7* übergreift.

Im Embryo wird *Abd-B* in den Parasegmenten 10-14 exprimiert, die morphologische Differenzierung dieser 4 Segmente wird jedoch durch die *cis*-regulatorischen Regionen *iab-5*, *iab-6*, *iab-7*, *iab-8* und *iab-9* und unterschiedlich lange *Abd-B* Transkripte bestimmt. Es gibt drei lange sowie eine kurze *Abd-B* Transkriptionseinheit, die in den Parasegmenten PS 14, bzw. nur in den PS 10-13 exprimiert werden (Celniker and Lewis, 1987; Sanchez-Herrero and Crosby, 1988; Zavortink and Sakonju, 1989). *iab-5* bis 7 steuert die *Abd-B* Expression in den PS 10-12 und *iab-8* und 9 in den davon posterior gelegenen Segmenten (Hopmann et al., 1995). *Fab7* reguliert *Abd-B* in den PS 12-14 und stimmt somit exakt mit dem RNA Expressionsmuster des CMMs überein. Es ist denkbar, dass Transkription durch das *Fab7* CMM nicht nur bei sich selbst, sondern auch in benachbarten *cis*-regulatorischen Sequenzen eine aufgelockerte Chromatinstruktur bewirkt bzw. aufrecht erhält und so die Kontrolle über *Abd-B* sichert.

In den weiter anterior gelegenen Parasegmenten (bis einschliesslich PS 10) wird *Abd-B* Expression über *MCP* und dessen benachbarte *cis*-regulatorische Einheiten gesteuert. Da *MCP* ebenfalls segmentspezifisch transkribiert wird (PS 10-14; persönl. Mitteilung M. Prestel) könnte sich dieser Vorgang dort in ähnlicher Weise wiederholen. Wie in Kapitel 2.2.3 gezeigt, wurden neben CMMs tatsächlich auch intergenische *cis*-regulatorische Sequenzen transkribiert.

3.5 *Cis*-regulatorische Sequenzen werden kolinear exprimiert

Nachdem von Schlüsselementen des BX-C (*Fab7*, *MCP* und *BXD*) nachgewiesen werden konnte, dass und wie sie transkribiert werden, folgten *in situ* Hybridisierungen zur

Identifizierung weiterer Transkripte regulativer intergenischer Sequenzen. Überraschenderweise wurde von vielen der gewählten Sequenzen tatsächlich nicht nur RNA gefunden, sondern auch ein lineares Expressionmuster entlang der anterior-posterioren Achse des Embryos beobachtet. Genau diese Linearität wird auch von den drei homöotischen Genen des BX-C eingehalten. D.h. auch die *cis*-regulatorischen Abschnitte werden nach dem Kollinearitätsprinzip nach Lewis (1978) exprimiert. Die segmentspezifische Expression intergenischer Sequenzen spricht für eine kontrollierende Funktion der Transkription bzw. der entstehenden RNAs. Im BX-C wurden bereits intergenische Transkripte identifiziert, jedoch konnte ihnen keine funktionelle Aufgabe zugeteilt werden (Hogness et al., 1985; Lipshitz 1987; Sanchez-Herrero und Akam 1989). Transkripte, deren cDNA vorhanden war, besaßen keine offensichtlichen proteinkodierenden Leseraster und scheinen daher eine andere Rolle zu spielen (Lipshitz et al. 1987; Cumberledge et al. 1990). Man könnte argumentieren, dass diese frühen Transkripte, Nebenprodukte eines übergreifenden, generell aufgelockerten Chromatinzustandes widerspiegeln. Da die Mehrzahl der RNAs jedoch die gleiche 5'-3' Orientierung besitzen, spricht dies gegen unkontrollierte, durch Chromatinauflockerung bedingte Transkription.

Die distal-proximalen Expressionsmuster der Sequenzen, die mit den BX-C Sonden 2 bis 11 identifiziert wurden, sind völlig identisch. Dies legt den Schluss nahe, dass die gleiche RNA dargestellt wurde. Es würde sich hierbei um ein sehr langes Transkript von mindestens 40 kb handeln. Die in weiter anterior gelegenen Segmenten, anhand der Sonden 12 und 15 (*iab-4*) detektierten Transkripte, stammten demnach von *cis*-regulatorischen Sequenzen, deren Aufgabe es ist, die Expression von *Abd-B* und *abd-A* in den Parasegmenten 10-12 bzw. 8-12 zu steuern.

Welche Rolle den „antisense“ (p-d), sprich den homöotischen Genen gegenüber invers orientierten, Transkripten zukommt, bleibt spekulativ. Möglicherweise existieren sie zusätzlich, um besonders kondensierte Chromatinstrukturen aufzulockern, die durch die „sense“ Transkripte allein nicht vollständig dereprimiert werden können. Da es aber bei der Expression von sense und antisense in derselben Zelle fast zwangsläufig zu dsRNA Bildung kommen könnte, darf einerseits ein endogener antisense Regulations- oder RNAi-Mechanismus nicht ausgeschlossen werden. Dann allerdings würde über RNAi die komplementäre endogene ssRNA vollständig degradiert. Dies ist eher unwahrscheinlich, da Fab7 RNA während der gesamten Entwicklung nachzuweisen war. Andererseits könnten beide Stränge unmittelbar, vielleicht sogar strangspezifisch in Proteinkomplexe eingebunden

werden. Die Vorstellung einer RNA-Protein Wechselwirkung wird im abschließenden Kapitel 3.8 ausgiebiger diskutiert.

3.6 *Fab7* RNAi ruft homöotische Transformationen hervor

Die Aufgabe des *Fab7* Elements und seiner RNA entsprach, nach den bisherigen Erkenntnissen dieser Arbeit, der Steuerung der *Abd-B* Expression in den PS 11 und 12, wie sie von Gyurkovics (1990) beschrieben wurde. Neu ist die Transkription des CMMs und dass dies eine ausschlaggebende Rolle bei der Derepression zu spielen schien. Degradierete man die *Fab7* RNA, bzw. das potentielle 40 kb Transkript mittels der RNAi Technik konnte eine Bandbreite von Phänotypen beobachtet werden. Ob dieses potentiell sehr lange Transkript dabei rein regulative Aufgaben erfüllt oder doch proteinkodierend ist, bleibt unklar. Die *Fab7*¹ Mutation, die sich in der Transformation von PS 11 nach 12 äußert, kommt im 1. Instarstadium aufgrund fehlender morphologischer Marker nicht so zur Geltung wie in älteren Entwicklungsstadien. Die Unterscheidung der Zähnchenreihe pA6-aA7 zwischen *Fab7*¹ und Wt konnte aber, wenn auch mit Schwierigkeiten, getroffen werden. Es ist zwar von RNAi Experimenten bekannt, dass sie nicht immer die vollständige „Loss-of-function“ Mutation hervorrufen, jedoch könnte mit der *Fab7* dsRNA ein größerer und übergreifender Effekt verursacht worden sein. Die Vielzahl an Phänotypen, die durch *Fab7*-RNAi erzielt worden sind, entsprachen homöotischen Mutationen. Fehlende Segmente oder Segmente gleicher Identität ließen vermuten, dass nicht nur *Fab7*-regulierte PS betroffen waren. Da dsRNA nicht nur zum Abbau der gleichlangen komplementären Sequenz, sondern des gesamten Transkripts des Zielgens führt, könnten die beobachteten Kutikulamutanten für ein sehr langes Transkript argumentieren. Dies könnte, wie im obenstehenden Kapitel erwähnt, 40 kb umfassen. Dieses lange Transkript würde sich über die *cis*-regulatorischen Bereiche *iab-8* bis *iab-5* erstrecken und sukzessiv zur deren „Freischaltung“ führen. Sollte die RNA eine Rolle bei der Bindung repressorischer Moleküle spielen, würde aber von der RNAi Maschinerie degradiert, könnte die RNA diese Aufgabe nicht mehr wahrnehmen und homöotische Transformationen wären die Folge (auf diese Hypothese wird im nachstehenden Kapitel noch eingegangen). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Degradation der *Fab7* Transkripte über RNAi offensichtliche Phänotypen verursacht hat und der RNA damit eine Rolle bei der segmentspezifischen Freischaltung regulatorischer Sequenzen zukommen könnte.

3.7 *Abd-B* Regulation ist unabhängig von *Fab7* RNA

Da *Fab7* das homöotische Gen *Abd-B* reguliert, stellte sich die Frage, ob die mittels *Fab7* RNAi verursachten Phänotypen in irgendeiner Weise der *Abd-B* RNAi Mutation gleichen würden. Sollte das *Fab7* RNA Molekül auf irgendeine Weise die Expression von *Abd-B* beeinflussen, könnte das der Fall sein. Dies könnte auf zwei Arten geschehen: über Reprimierung oder Aktivierung der *Abd-B* Expression bzw. über eine Wechselwirkung mit dem ABD-B Proteins selbst. *Abd-B* Deletionen äußern sich in anterioren Transformationen der PS 10-14, da die PS nun vollständig unter *Ubx* und *abd-A* Kontrolle stehen. Soweit *Abd-B* RNAi nicht vor der Kutikulabildung letal war, rief *Abd-B* RNAi einen derartigen Transformationsphänotyp hervor. Die Degradation von *Abd-B* RNA in den Parasegmenten 10-14 äußerte sich in anterioren Transformationen der letzten drei Abdominalsegmente. Dieser Phänotyp unterschied sich deutlich von dem *Fab7* RNAi Phänotyp. Das könnte einerseits daran gelegen haben, dass *Abd-B* in den PS 10-14 exprimiert, jedoch nur in den PS 12-14 von *Fab7* kontrolliert wird. Im Falle einer *Fab7* RNAi bedingten Überexpression von *Abd-B* hätten A8-spezifische Strukturen in anterioren Segmenten sichtbar werden müssen (Lamka et al., 1992). Keine der beiden Möglichkeiten (Reprimierung oder Aktivierung von *Abd-B*) scheint auf die *Fab7* RNAi verursachten Kutikulaphänotypen zuzutreffen.

Möglicherweise wirkt *Fab7* RNAi indirekt auf die *Abd-B* Expression. Wenn *Fab7* RNA oder die potentielle 40 kb RNA mit repressorischen Proteinen in Wechselwirkung träte und so Chromatinstrukturen in großen Bereichen auflockern oder verändern würde, hätte *Fab7* RNAi möglicherweise weiträumigere Reprimierung zur Folge. Würde *Fab7* RNAi diese Wechselwirkung verhindern und die repressorischen Proteine verblieben oder bänden erneut an ihre Orte, könnte *Abd-B* nicht exprimiert werden.

Unter Umständen spielte der Zeitpunkt der Injektion eine Rolle. Würde die *Fab7* dsRNA injiziert, bevor die endogene RNA exprimiert wird, läge die RNAi Degradationsmaschinerie sozusagen abfangbereit vor. Sie könnte die neuen endogenen Transkripte dann unmittelbar angreifen. Im umgekehrten Fall, falls die dsRNA erst nach, oder zeitgleich zur Expression der endogenen Transkripte injiziert worden wäre, hätte sie keinen unmittelbaren Einfluss mehr auf den weiteren Werdegang der *Fab7* RNA haben können.

In ähnlicher Weise wurden Mutationen durch die Injektion von *MCP* bzw. *bxd* dsRNA erzeugt, die ebenfalls in homöotischen Transformationen resultierten. Injektion von *MCP* dsRNA hatte folglich auch zu einer Missregulation von *Abd-B* und Injektion von *bxd* dsRNA zu *abd-A* Fehlregulation geführt. Es könnte sich bei der Transkription und Freischaltung *cis*-

regulatorischer Sequenzen nahe dieser Elemente um ähnliche Mechanismen wie bei *Fab7* handeln.

In wenigen Fällen konnte in *Fab7* dsRNA injizierten Tieren ein Phänotyp in Adulten beobachtet werden. Er äußert sich in unvollständiger Bildung der abdominalen Tergite. Wahrscheinlich waren die meisten embryonal verursachten Missbildungen zu schwerwiegend, um ein Überleben bis ins Adultstadium zu ermöglichen. Man könnte argumentieren, dass der Phänotyp, in Embryonen wie Adulten, allein schon durch die mechanische Störung der Injektionsnadel verursacht wurde und Morphogengradienten verwirbelte. Allerdings hätte diese Beobachtung dann bei Injektionen aller dsRNAs gleichermaßen beobachtet werden müssen. Doch in Adulten der *wg* dsRNA Injektion wurde kein abdominaler Phänotyp beobachtet. *wg* dsRNA rief bei fast ein Fünftel der Injizierten einen Phänotyp hervor, indessen wies bei *Fab7* dsRNA nur ein geringer Prozentsatz Phänotypen auf. Da ein großer Anteil der *Fab7* dsRNA Injizierten noch vor Ausbildung der Kutikula starben, ist die *Fab7* RNA möglicherweise zu einem sehr frühen Zeitpunkt an der Regulation der homöotischen Gene beteiligt.

3.8 Zusammenfassung und Modell

In der Evolution des BX-C ist die lineare Anordnung der homöotischen Gene und ihrer *cis*-regulatorischen Sequenzen erhalten geblieben. Intergenische nichtkodierende Transkripte wurden bereits vor über 17 Jahren identifiziert, doch ihre funktionelle Rolle blieb unklar (Hogness et al., 1985; Lipshitz 1987; Sanchez-Herrero und Akam, 1989). Sogar im Falle einer Region, in der ein potentiell CMM in der Transkriptionseinheit für das *Ubx* Gen vermutet wird, konnte ein früh exprimiertes kurzlebiges Transkript identifiziert werden (Hogness et al., 1985). Der Vorgang der Transkription scheint somit auszureichen, ein CMM vom reprimierten in den aktivierten Zustand umzuschalten. Man könnte argumentieren, dass diese frühen Transkripte nur eine Folge eines relativ offenen embryonalen Chromatinzustandes darstellen und zufällig auftreten. Dagegen spricht, dass andere Gene im oder nahe des BX-C zu diesem frühen Zeitpunkt überhaupt noch nicht aktiviert werden, also nicht einer übergreifenden aufgelockerten Chromatinstruktur unterworfen sein können (Martin et al., 1995). Höchst bemerkenswert ist das Expressionmuster der intergenischen Transkripte. Es unterliegt derselben strikten zeitlichen und räumlichen Kontrolle wie die homöotischen Gentranskripte.

Darüber hinaus argumentieren Beobachtungen bei ähnlich regulierten Genen für einen am CMM-Schaltprozess ursächlichen Mechanismus der Transkription. Die Chromatinstrukturen und das genetische Arrangement des BX-C können mit dem β -Globin Cluster ver-

glichen werden, da dessen fünf Gene ebenso in einer linearen Weise angeordnet sind. Auch die Kontrolle über die β -Globin Expression ist mitunter von *cis*-regulatorischen Sequenzen, den LCRs abhängig. LCRs besitzen DNase I hypersensitive Stellen (HS), die einzeln deletiert kaum einen Phänotyp hervorrufen. Deshalb geht man heute davon aus, dass sie kooperativ an der Regulation beteiligt sind (Bungert et al., 1995; Fiering et al., 1995; Hug et al., 1996). Diese DNase I hypersensitiven Domänen besitzen hyperacetylierte Histone, die sich über mehrere Kilobasen erstrecken (Hebbes et al., 1994; Bell und Felsenfeld, 1999). Interessanterweise wurden in Mäusen mit transgenem humanen β -Globin Locus ebenfalls intergenische Transkripte in der gleichen Transkriptionsrichtung der β -Globin Gene festgestellt. Sie können bis zu 30 kb lang sein und wurden in der Nähe aktiver Gene gefunden. Ihre Funktion wird im Zusammenhang mit Chromatinumstrukturierung und Aufrechterhaltung aktiver Domänen gesehen (Ashe et al., 1997; Gribnau et al., 2000; Ristaldi et al., 2001). Seit man von der Assoziation von SWI/SNF und HATs mit der RNA Polymerase II weiss, geht man davon aus, dass sie gemeinsam eine Rolle bei der Umstrukturierung von Chromatin spielen könnten (Wilson et al., 1996; Wittschieben et al., 1999).

Das etablierte System des transgenen *Fab7* CMM stellt zwar eine Imitation der natürlichen Situation dar, doch nur auf diese Weise war die Entdeckung der CMM Schaltfunktion und der Transkription durch das PRE möglich. Auch die RNAs des endogenen *Fab7* Elements im BX-C wiesen nachdrücklich auf einen essentiellen Transkriptions-Mechanismus in der frühen Embryonalentwicklung hin. Die Signifikanz der Transkripte durch das CMM wurde im Transgenexperiment mit gekürzten *Fab7* Elementen bestätigt. *Fab7* CMMs, deren proximaler Abschnitt fehlte, wurden nicht transkribiert und konnten ihre Aufgabe als Zellgedächtnisträger nicht mehr erfüllen. Aus diesem Grund wurde ein kryptischer Promotor in dieser Region vermutet. Auch von β -Globin Transgenen wurde gezeigt, dass der Enhancer, bzw. die 5' hypersensitive Stelle H2 der β -Globin LCR (Locus Control Region), transkribiert wird. Das Transkript nimmt seinen Ursprung innerhalb des Enhancers und setzt sich unabhängig von der Position und Orientierung des Enhancers in das benachbarte Gen fort (Kong et al., 1997). Da nichtkodierende RNAs sogar in Transgenen wie *Fab7* oder β -Globin ihren Ursprung haben können, ist denkbar, dass intergenische Transkription ein grundsätzliches Charakteristikum aktivierter Regionen darstellt.

Wie aber könnte die Transkription des CMMs eine Veränderung des Chromatins bewirken und wie kann dabei der aktivierte Zustand stabil vererbt werden?

Möglicherweise spielt das Transkript selbst eine eher eine sekundäre Rolle. Jedoch lassen die Ergebnisse der RNAi Experimente keinen eindeutigen Schluss zu, ob die gefun-

denen Transkripte nicht doch proteinkodierend sein könnten. Allerdings sprechen die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit vielmehr für eine essentielle Beteiligung der Transkriptionsmaschinerie an sich (Abb. 3). Es ist vorstellbar, dass sich der RNA Polymerase II Komplex, reguliert durch Transkriptionsfaktoren der frühen Segmentierungsgene, durch das CMM bewegt. Dabei entfernt er reprimierende PcG-Komplexe oder stört deren Interaktion mit der DNA. Silencing am CMM wäre sozusagen eine Art Grundzustand, der durch einen aktiven mechanischen Prozess umgestaltet wird. Dem entstandenen Transkript kommt in diesem Moment noch keine Rolle zu. Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Chromodomäne des Polycomb Proteins vermutlich unspezifisch und indirekt, dafür aber stark an RNA bindet (Möhrle 1994; Breiling 1998). Von MOF, einem weiteren Mitglied der Chromodomänen-Familie, wurde sogar gezeigt, dass es *in vivo* spezifisch mit roX2 RNA interagiert (Akhtar et al., 2000). So könnten also die RNA Produkte der intergenischen Sequenzen und CMMs an Silencing vermittelnde Proteine wie PC binden und so deren erneute Bindung an die DNA blockieren (Abb. 3 A). Da ein in der Embryogenese aktiviertes CMM stabil über die gesamte Entwicklung vererbt wird, muss im Anschluss an die Freischaltung des CMMs dessen epigenetische Markierung erfolgen. trxG Proteine sind massgeblich an der Aufrechterhaltung „offener“ Chromatinstrukturen beteiligt. Es ist daher wahrscheinlich, dass trxG Proteine das dereprimierte Chromatin erkennen. Sie erhalten Zugang zur DNA und gehen hochmolekulare DNA-Proteinkomplexe ein, um diesen Zustand zu bewahren. Andererseits ist es vorstellbar, dass die trxG Proteine bestimmte Signale erkennen müssen, um spezifisch binden zu können, denn außer dem GAGA Faktor ist noch kein trxG Protein bekannt, welches sequenzspezifisch an DNA binden kann.

Gängige Signale zur epigenetischen Markierung sind Modifizierungen der Histone oder der DNA selbst. Das modifizierende Enzym müsste also in der Lage sein, umstrukturiertes Chromatin zu erkennen und ausfindig zu machen. Obwohl der BX-C zum größten Teil aus *cis*-regulatorischen Sequenzen besteht, stellen die CMMs nur einen kleinen Teil dar. Das modifizierende Enzym muss daher auf irgendeine Weise an seinen Zielort dirigiert werden. Möglicherweise geschieht die Dereprimierung der CMMs durch die RNA Polymerase II simultan mit der epigenetischen Kennzeichnung. Die Komponente zur epigenetischen Markierung, sprich ein biochemischer Modifikator, könnte schon im Komplex mit der Transkriptions-Maschinerie vorliegen und dadurch an der DNA entlang gleiten (Abb. 3 B). Im Falle von *Fab7* könnte es sich dabei beispielsweise um eine Histon H4 Acetyltransferase handeln, da die stabile Vererbung des aktivierten *Fab7* CMM Transgens mit Histon H4 Hyperacetylierung korreliert (Cavalli und Paro, 1999).

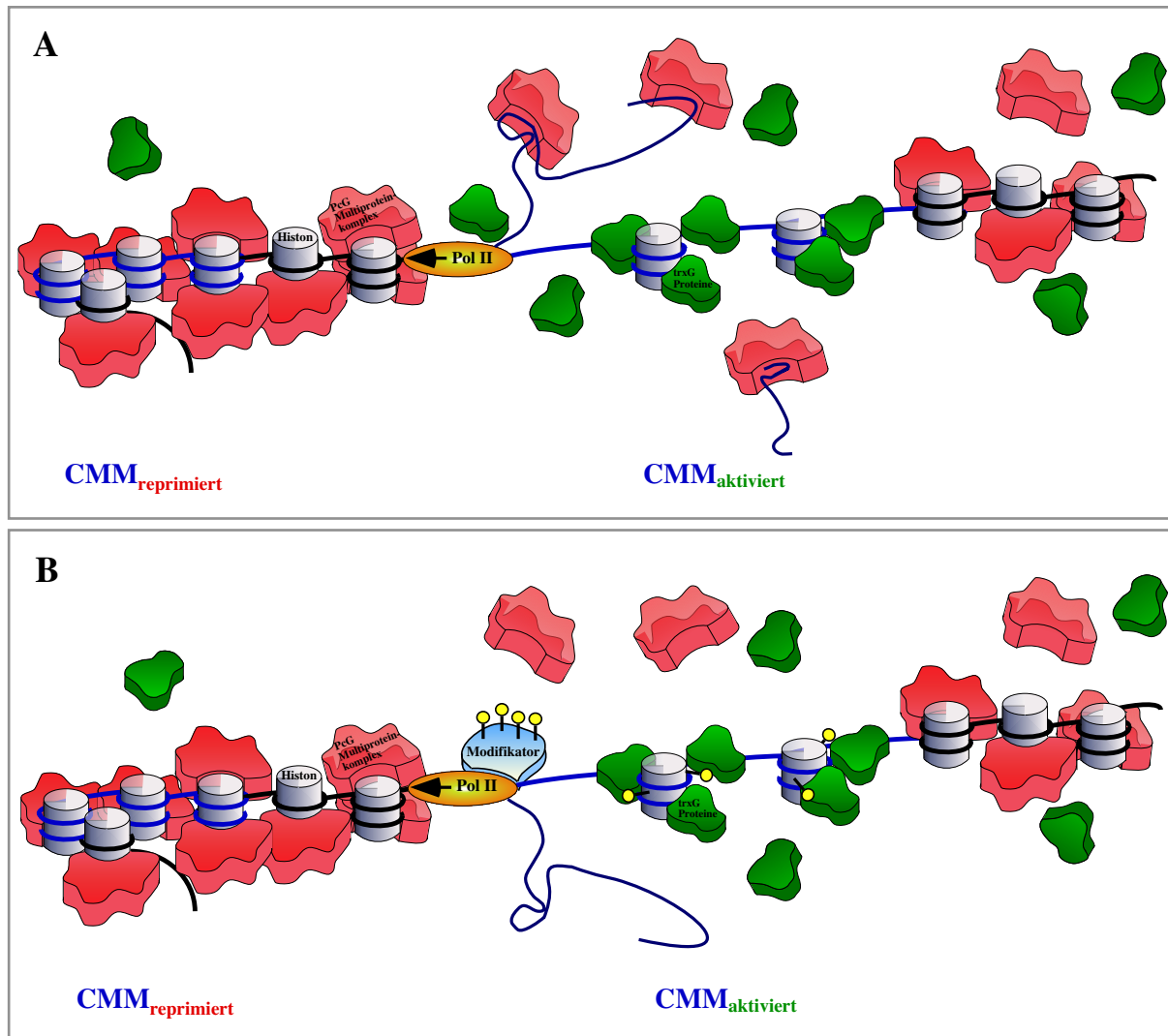


Abb. 3: Modell zur CMM Umschaltung. Nachdem die frühen Regulatoren wie Lücken- und Segmentierungs-Gene das Expressionsmuster der homöotischen Gene gebildet haben, müssen CMMs (blauer DNA Strang) den etablierten Status über die Entwicklung hinweg erhalten. Hierzu muss zwischen reprimierten und transkriptionell aktivem Chromatin unterschieden werden. Transkription durch ein CMM schaltet das Element vom reprimierten in den aktivierten Status. Es sind zwei Möglichkeiten denkbar, die sich gegenseitig nicht ausschließen: In beiden durchläuft die RNA Polymerase II intergenische Regionen. In Modell **A** verdrängt der Polymerase Komplex (gelb) die Silencing Proteine (rot) direkt und/oder die transkribierte RNA interagiert mit den gebundenen PcG Multiproteinkomplexen, beispielsweise über deren Chromodomäne. So können reprimierende Proteine vom CMM verdrängt und ferngehalten werden und den trxG Proteinen (grün) wird Bindung ermöglicht, um den aktivierten Zustand zu erhalten. Als Konsequenz wird Chromatin für weitere epigenetische Modifikationen zugänglich.

In Modell **B** komplexiert die RNA Polymerase II bereits vor der Transkription mit Histon modifizierenden Enzymen (blau). Die epigenetische Markierung erfolgt hier während der Transkription und ermöglicht so eine stabile Vererbung der „offenen“ Chromatinstruktur.

Diese an Polytänchromosomen gefundene Acetylierung von H4 schließt jedoch andere biochemische Modifizierungen nicht zwangsläufig aus. Veränderungen weiterer Nukleosomenbausteine durch Methylierung, Phosphorylierung oder Deacetylierung sind ebenso denkbar (siehe Review Jenuwein und Allis, 2001).

Theoretisch könnte die epigenetische Markierung auch auf DNA-Ebene geschehen. In vielen höheren Organismen stellt Methylierung eine der gängigsten epigenetischen DNA Modifizierungen dar, doch in *Drosophila* ist z.B. Methylierung von „CpG islands“ nur äußerst geringfügig vorhanden (Lyko et al., 2000), daher bleibt ihre Funktion in *Drosophila* spekulativ. Es ist jedoch anzumerken, dass Chromodomänen, wie die von HP1 beispielsweise, selektive Affinität zu methyliertem Histone H3 aufweist (Bannister et al., 2001). Im allgemeinen scheint die Intention aller denkbaren Modifizierungen letztendlich eine Affinitäts-erhöhung zu Chromatin-assoziierten Proteinen wie trxG oder PcG Proteinen zu sein.

Einerseits ist auch denkbar, dass die Transkription durch das CMM während der gesamten Entwicklung in den relevanten Segmenten aufrechterhalten werden muss. Andererseits könnte man sich vorstellen, dass die RNA stabil, aber zugleich sehr selten ist. Anhand der RT-PCR Analyse konnte die RNA des *Fab7* CMMs jedenfalls in allen Entwicklungsstufen nachgewiesen und scheint daher eine Rolle bei der Dereprimierung von Chromatinstrukturen zu spielen.

3.9 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigte neue Möglichkeiten der epigenetischen Regulation durch einen in diesem Zusammenhang bislang unvermuteten Mechanismus auf transkriptioneller Ebene. Einige Fragestellungen konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht angegangen werden und blieben offen. Um die Chromatinstruktur eines CMMs vor und nach dem Umschalten besser beschreiben zu können, müsste die Komposition der PcG und trxG Proteine am transgenen *Fab7* CMM untersucht werden. Das endogene *Fab7* Element eignet sich nur schwer zu diesem Zweck, da es wie erwähnt höchstwahrscheinlich segments- und zellspezifische Unterschiede aufweist. Erkenntnisse könnten mittels der X-ChIP Methode und der hergestellten FLW-1/*Fab7*¹ Linie erzielt werden. Nur ohne den Hintergrund des endogenen *Fab7* Elements kann das CMM-Transgen vor und nach dem Umschalten untersucht werden.

Neben den Zellgedächtnis vermittelten Proteinen ist es auch von Bedeutung die Herkunft und Regulation der CMM Transkripte näher zu charakterisieren. Eine Kartierung der Promotoren wird sich auch weiterhin als schwierig erweisen, da es ist fraglich ist, ob für jedes Transkript nur ein einziger Promotor existiert. Durch Einkreuzen von Mutanten der maternalen Gene oder Segmentierungsgene könnte aber untersucht werden, welche Faktoren die intergenische Transkription im BX-C verursachen.

Interessant wäre auch, neue Konstrukte zu entwerfen, die *Fab7* nicht stromaufwärts der UAS Sequenz, sondern zwischen UAS und den Reportergenen tragen. Auf diese Weise könnte gezielte und stärkere Transkription durch das CMM erreicht werden. Man könnte auch anstatt der UAS einen T7 Promotor verwenden und die T7 Polymerase unter entsprechenden Hitzeschock- oder endogenen Promotoren exprimieren. In diesen Konstrukten könnten ebenfalls proximale Sequenzen des *Fab7* Elements deletiert werden um zu testen, ob Transkription durch das PRE genügt, oder ob auch Transkription durch das Boundary und den proximalen Abschnitt notwendig ist. Ein zusätzliches Konstrukt zur Herstellung transgener Fliegen bestünde aus der proximalen Sequenz und dem Boundary von *Fab7*, wobei hier abzusehen ist, dass ohne das PRE kein Silencing zu erwarten wäre. Ähnlich wäre ein Konstrukt, dessen PRE oder Boundary sich nach der Umschaltung mit dem FLIP/Frt System herausrekombinieren ließe.

Bis zum Abschluss dieser Arbeit war noch nicht geklärt, ob dsRNA *cis*-regulatorischer Sequenzen des BX-C tatsächlich existiert und einen Teil des Mechanismus zur Regulation der homöotischen Gene darstellen könnte. Aufschluss darüber könnte anhand der Isolierung niedermolekularer Nukleinsäuren (bis ca. 50 bp) aus Embryonen gewonnen werden. Die RNAi-typischen dsRNA 21-23 Oligomere könnten mittels Northern Blot nachgewiesen werden.

Der Modellorganismus *Drosophila* teilt viele homologe Gene mit Vertebraten. Ihre Funktion ist dabei erhalten geblieben. Von großem Interesse wäre daher auch Parallelen, wie beispielsweise mögliche intergenische Transkripte in den homologen Hox Genen der Maus zu untersuchen. Deren lineare Anordnung als Gencluster könnte ein Hinweis auf ähnliche, durch Transkription regulierte Chromatinstrukturen sein, wie die in dieser Arbeit im BX-C untersuchten.

4 Material

4.1 Plasmide

pBluescript	pBS SK- bzw. KS+ Klonierungsvektor (Stratagene)
pBS KSII(+)/wg	2924 bp <i>wingless</i> cDNA kloniert in pBluescript (S. Cohen)
p4344	4344bp Fab7 <i>EcoRI</i> Fragment subkloniert in die <i>EcoRI</i> Schnittstelle von pBluescript KS+ (Helen Strutt)
pUAST	pCaSpeR-βgal (Thummel)
pUChsπΔ2-3	pUChsπΔ2-3 ist ein modifiziertes Helferplasmid mit Ampicillin-Resistenzgen für die P-Element vermittelte Transformation von <i>Drosophila</i> -Embryonen. Die Modifikation besteht in der Deletion Δ2-3 des zwischen dem zweiten und dritten Exon gelegenen Introns des Transposasegens. Dadurch ist die Expression der durch diese modifizierte Sequenz kodierten Transposase unabhängig von dem in den Keimzellen stattfindenden Spleißprozessen und erfolgt somit ubiquitär (Don Rio, UC, Barkely)
pU/l5	β-Galaktosidase Expressionsvektor (Zink et al., 1995)
pUZ	von pU/l5 abgeleiteter Transformationsvektor mit <i>NotI/SpeI</i> Polylinker (Lyko et al., 1997)
p5F24 25,2	pU/l5 Vektor mit <i>HindIII</i> 3,6 kb <i>Fab7</i> Element in p-d Orientierung (Zink et al., 1995)
p5F3	pU/l5 Vektor mit <i>HindIII</i> 3,6 kb <i>Fab7</i> Element in d-p Orientierung (Zink et al., 1995)
pBS SK-/3,6Fab7#5	pBS SK- enthält das über <i>HindIII</i> klonierte 3,6 kb <i>Fab7</i> Element aus p5F24 25,2 in d-p Orientierung (Originalsequenz im BX-C d-p: 82553-86170) (diese Arbeit)
pBS SK-/3,6Fab7#6	pBS SK- enthält das über <i>HindIII</i> klonierte 3,6 kb <i>HindIII Fab7</i> Element aus p5F24 25,2 in p-d Orientierung (Originalsequenz im BX-C d-p: 82553-86170) (diese Arbeit)
pHE 10	pBS SK-/800 bp <i>Fab7</i> PRE, p-d Orientierung (über <i>NotI</i> kloniert) (G. Cavalli und H. Ehret)

pHE 12	pBS SK-/1,8 kb <i>Fab7</i> (p-d Orientierung) PRE und Boundary (Nkt 82795-84608 im BX-C (d-p), (<i>Fab7 HindIII</i> Fragment in <i>NotI</i> Schnittstelle von pBS kloniert) (G. Cavalli und H. Ehret)
pGR1	pUZ mit <i>NotI</i> 1,8 kb <i>Fab7</i> Fragment (PRE und Boundary) in d-p Orientierung (Nkt 82795-84608 im BX-C (d-p)) (diese Arbeit)
pGR2	pUZ mit <i>NotI</i> 1,8 kb <i>Fab7</i> Fragment (PRE und Boundary) in p-d Orientierung (Nkt 82795-84608 im BX-C (d-p)) (diese Arbeit)
pGR3	pUZ mit <i>Fab7</i> PRE ; p-d Orientierung (Nkt 82787-83659 im BX-C), über <i>NotI</i> kloniert (diese Arbeit)
pGR4	pUZ mit <i>Fab7</i> PRE, d-p Orientierung (Nkt 83659-82787 im BX-C), über <i>NotI</i> kloniert (diese Arbeit)
pCR4-TOPO	Klonierungsvektor (Invitrogen)
pCR4-TOPO/DROSO1 C4	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO1 C4 in d-p Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 1 verwendet wurde
pCR4-TOPO/DROSO1 E1	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO1 E1 in d-p Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 2 verwendet wurde
pCR4-TOPO/DROSO1 G12	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO1 G12 in p-d Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 4 verwendet wurde
pCR4-TOPO/DROSO1 H1	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO1 H1 in d-p Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 5 verwendet wurde
pCR4-TOPO/DROSO1 H2	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO1 H2 in d-p Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 6 verwendet wurde
pCR4-TOPO/DROSO1 H3	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO1 H3 in d-p Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 7 verwendet wurde
pCR4-TOPO/DROSO1 H4	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO1 H4 in p-d Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 8 verwendet wurde
pCR4-TOPO/DROSO1 H5	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO1 H5 in d-p Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 9 verwendet wurde

pCR4-TOPO/DROSO1 H6	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO1 H6 in d-p Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 10 verwendet wurde
pCR4-TOPO/DROSO2 E1	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO2 E1 in d-p Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 13 verwendet wurde
pCR4-TOPO/DROSO2 D5	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO2 D5 in p-d Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 14 verwendet wurde
pCR4-TOPO/DROSO3 C9	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO3 C9 in p-d Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 17 verwendet wurde
pCR4-TOPO/DROSO2 G6	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO2 G6 in p-d Orientierung (diese Arbeit)
pCR4-TOPO/DROSO2 H12	enthält das über TOPO TA klonierte PCR Produkt DROSO2 H12 in p-d Orientierung (diese Arbeit), das als <i>in situ</i> Sonde 16 verwendet wurde

4.2 Bakterienstämme

DH5 α	Genotyp: <i>E.coli</i> , F' <i>endA1</i> , <i>hsdR</i> 17(<i>r_K⁻m_K⁺</i>), <i>sup</i> E44, <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , (<i>Nal^r</i>), <i>relA1</i> , Δ (<i>lacIZYA-argF</i>), <i>U196</i> , <i>deoR</i> (ϕ 80d <i>lac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15)
XL-1 Blue	Genotyp: <i>E.coli</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI^qTAM15</i> TN10(Tet ^r)] (Stratagene)
One Shot® TOP 10	Elektrokompetenter <i>E. coli</i> Stamm: Electrocomp™ <i>E.coli</i> ; Teil des TOPO TA Cloning© Kit for Sequencing (Invitrogen). Genotyp: F ⁻ <i>mcrA</i> D (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> DM15 <i>DlacX74 deoR recA1 araD139</i> D(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i> .

4.3 *Drosophila melanogaster*-Fliegenstämme

Linie	Erläuterung:
Oregon R	Wildtypstamm
Canton S	Wildtypstamm

hs-Gal47-1(II)/CyO	exprimiert GAL4 nach Hitzeschock. Freundlicherweise von A. Brand (Wellcome/CRC, Cambridge) zur Verfügung gestellt
w ¹¹¹⁸	Mutante mit weißem Augenphänotyp, bedingt durch partielle Deletion des <i>white</i> -Gens
w ⁻ ; w ^{hsGal4CyO/Sp}	Auf das <i>CyO</i> Balancer Chromosom rekombiniertes hsGal4; dabei funktioneller Verlust des transgenen mini- <i>white</i> Gens (Geschenk von M. Prestel)
GC44 w ⁻ ; Fab7 ¹ :	4 kb <i>Fab7</i> Deletion (Gyurkovics et al., 1990) wurde in den w ¹¹¹⁸ Hintergrund gekreuzt (diese Arbeit)
FLW-1	X-chromosomale Integration von p5F24 25,2 bei 13 F, hsGal4/CyO, enthält jedoch eine Duplikation des P-Elements mit unvollständigem <i>Fab7</i> Element (vgl. Abb. 4) (Cavalli und Paro, 1998)
FLW-1/Fab7 ¹	X-chromosomale Integration von p5F24 25,2 (Duplikation) bei 13F, w ^{hsGal4CyO/Sp} ; Fab7 ¹ (diese Arbeit)
fLW-1	X-chromosomale Integration von p5F3 bei 13F, hsGal4/CyO (Cavalli und Paro, 1998)
fLW-1/Fab7 ¹	X-chromosomale Integration von p5F3 bei 13F, w ^{hsGal4CyO/Sp} ; Fab7 ¹ (diese Arbeit)

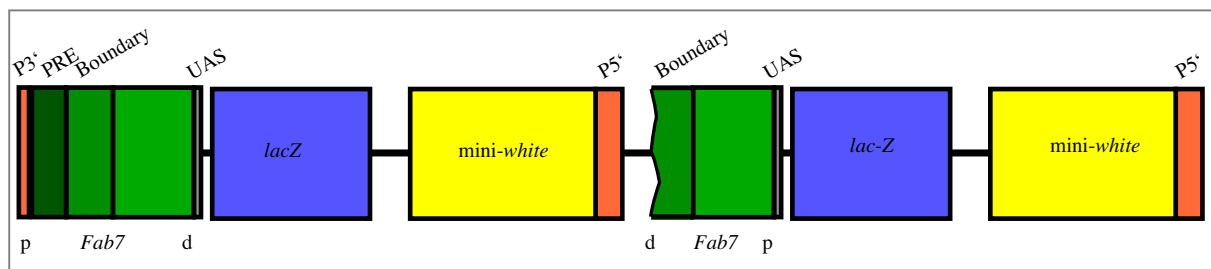


Abb. 4: In der FLW-1 Linie wurde ein „Tandem repeat“ des integrierten P Elements p5F24 25,2 entdeckt. Die zweite Kopie (rechts) ist jedoch unvollständig. Es fehlen Teile des *Fab7* PREs (persönl. Mitteilung G. Cavalli).

Nachstehende transgene *Drosophila melanogaster* Linien wurden in dieser Arbeit hergestellt. Die Namensgebung erfolgt nach dem benutzten Transformationsvektor (pGR1 bis pGR4).

Transgene Linien mit pGR1 Konstrukt	Chromosomale Integration des P- Elements	Augenfarbe; mini- <i>white</i> Expression
pGR1-1a	X	weiß-rot variegierend
pGR1-1a;w ^{hsGal4CyO/Sp}	X	weiß-rot variegierend
pGR1-3a	II	rot

Transgene Linien mit pGR1 Konstrukt	Chromosomale Integration des P- Elements	Augenfarbe; mini-<i>white</i> Expression
pGR1-3b	III	rot
pGR1-3c	III	kräftiges rot
pGR1-3c; hsGal4/ <i>CyO</i>	III	kräftiges rot
pGR1-5	II	weiß-rot variegierend
pGR1-6	III	kräftiges rot
pGR1-11	II	orange-rot variegierend
pGR1-12	III	gelb-orange, leicht variegierend
pGR1-12b		weiß-rot variegierend
pGR1-13	II	orange
pGR1-14c	II	orange variegierend
pGR1-15	X	stark rot, leicht variegierend
pGR1-16	II	pink-rot variegierend
pGR1-17	III	rot
pGR1-17; hsGal4/ <i>CyO</i>	III	rot
pGR1-19n	II	gelb-orange
pGR1-20	II	rot
pGR1-21	II	rot

Transgene Linien mit pGR2 Konstrukt	Chromosomale Integration des P- Elements	Augenfarbe; mini-<i>white</i> Expression
pGR2-1a	II	orange-rot
pGR2-1b	III	orange-rot
pGR2-1b; w ^{hsGal4} <i>CyO/Sp</i>	III	rot
pGR2-1c	III	rot
pGR2-2a	II	orange-rot
pGR2-2i		orange-rot
pGR2-3a	III	orange
pGR2-4a	II	orange
pGR2-4c	III	gelb-orange F2
pGR2-5a	III	rot

Transgene Linien mit pGR2 Konstrukt	Chromosomale Integration des P- Elements	Augenfarbe; mini-<i>white</i> Expression
pGR2-5c	III	rot
pGR2-6a	III	rot
pGR2-6b	X	orange
pGR2-6c	II	rot
pGR2-7a	X	orange-rot
pGR2-8	II	stark weiß-rot variegierend
pGR2-8b	II	rot
pGR2-9a	III	orange F2
pGR2-10b	II	rot
pGR2-12	III	orange
pGR2-14a	II	rot
pGR2-16	X	orange
pGR2-16; w ^h Gal4CyO/Sp	X	orange
pGR2-16a2	II	weiß-rot, stark reprimiert
pGR2-17a	X	orange rot
pGR2-17a; w ^h Gal4CyO/Sp	X	orange rot
pGR2-17b		rot
pGR2-18a	II	weiß; extrem reprimiert
pGR2-18b	X	orange
pGR2-19d		rot
pGR2-20d	III	rot
pGR2-21a	III	orange

Transgene Linien mit pGR3 Konstrukt	Chromosomale Integration des P- Elements	Augenfarbe; mini-<i>white</i> Expression
pGR3-1.2		stark variegierend
pGR3-1.4	II	stark rot, leicht variegierend
pGR3-2.2	III	rot
pGR3-2.2, hsGal4/CyO	III	rot
pGR3-2.10	III	rot

Transgene Linien mit pGR3 Konstrukt	Chromosomale Integration des P- Elements	Augenfarbe; mini-<i>white</i> Expression
pGR3-2.15	III	rot
pGR3-3.3		orange-rot variegierend
pGR3-3.7	III	stark weiß-rot variegierend
pGR3-3.7; w ^{hs} Gal4 <i>CyO/Sp</i>	III	stark weiß-rot variegierend
pGR3-4.2		M: rot, W: gelb-orange variegierend
pGR3-5.1	II	rot
pGR3-6.1	II	stark weiß-rot variegierend
pGR3-9.1	II	rot

Transgene Linien mit pGR4 Konstrukt	Chromosomale Integration des P- Elements	Augenfarbe; mini-<i>white</i> Expression
pGR4-1a	II	leicht bis stark variegierend rot
pGR4-1b	III	rot, leicht variegierend
pGR4-1f	III	rot
pGR4-3d	X	orange
pGR4-3d, hsGal4/ <i>CyO</i>	X	orange
pGR4-4b	II	rot
pGR4-6b	III	weiß-rot variegierend
pGR4-6d	II	rot
pGR4-8b	III	orange-rot
pGR4-8b; hsGal4/ <i>CyO</i>	III	orange rot
pGR4-8c	II	rot
pGR4-9	III	orange
pGR4-9; hsGal4/ <i>CyO</i>	III	rot
pGR4-10a	III	weiß-rot variegierend
pGR4-10a; hsGal4/ <i>CyO</i>	III	weiß-rot variegierend
pGR4-13		stark variegierend, weiß-rot
pGR4-14b	II	rot, leicht variegierend
pGR4-15	II	variegierend rot

Transgene Linien mit pGR4 Konstrukt	Chromosomale Integration des P-Elements	Augenfarbe; mini- <i>white</i> Expression
pGR4-16a	X	rot
pGR4-17a	II	weiß-rot variegierend
pGR4-19		orange-rot variegierend

4.4 Primer

Primer	Verwendungszweck	Sequenz
Fab7-1	RT-PCR	GTTGATTAACCCTTAGCATGTCCGTGG
Fab7-2	RT-PCR	GAGGAGGAAAGTGTCCAATGAGATTTC
Fab7-3	RT-PCR	GATTTAGCAGCGGAACGGTAGTGTAG
Fab7-4	RT-PCR	CTCGTTAATTTTATGGGTTCAAAATCGGT CC
Fab7-5	RT-PCR	CAGTACTCCGCGGAGGACAGTACT
Fab7-6	Primer Extension, RT-PCR	CCATGGTATTTTATGCTTAGTCGGGTG
Fab7-7	Primer Extension, RT-PCR	GAATACTTGCCTACGGTTATGAGTGTG
Fab7.7 ^Δ	Primer Extension	CAGCCCGAAAATGCCCAACAAAA
LacZFOR	RT-PCR	GAGCCTGCTAAAGCAAAAAAGAAGTCACC
LacZREV	RT-PCR, Primer Extension	CGTAACCGTGCATCTGCCAGTTTGAGG
α1Tubulin-For	RT-PCR	GAAACGCCTGCTGGGAGCTCTAC
α1Tubulin-Rev	RT-PCR	TCGACGATCTCCTTGCCGATGGTG
GAGA1 for ^Δ	Primer Extension	CCAATCAAACCATCAAACCTAGCCGCT
GAGA1 rev ^Δ	Primer Extension	CAAATGGCAGCTGTCACGGGGAAGCA
T7-lacZ-for	Primer Extension	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGA GCCTGCTAAAGCAAAAAAG
T3-lacZ-rev	Primer Extension	GCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGCGTAA CCGTGCATCTGCCGGT
FLW-1a	PCR	TTCGGCTATCGACGGGACCACCTTA
FLW-1b	PCR	AGAACAGGACGAGTGGCAAAAGCTGG
FLW-1/white	PCR	CAACTATAATAATAAGAATACATTTAATTT AGA
Fab7prox/T7	RNAi	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCG TTAATTTTATGGGTTCA

Primer	Verwendungszweck	Sequenz
Fab7dist/T7	RNAi	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAT TTACAGATTGATTTCGGT
bxd 5'RNAi §	RNAi	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCG ACGGCAAATGTCAAAGAA
bxd 3'RNAi §	RNAi	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCA TTTAACTGCCTGGCACA
Mcp5'RNAi§	RNAi	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGT ATTCCACTTACGCTCCCG
Mcp3'RNAi§	RNAi	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGG GAGCTCATGCGCAGTATG
Abd-B R114430*	RNAi	TGGCGCCCCTAGATGGGTGGATTATCCGT GGGAG
Abd-B S114430 *	RNAi	TGAGGTACGCGTGGGCGGTCAGCTGCAAA TTTCT
pHE13/T7-For	RNAi	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGC GGCCGCTCTAGAAAACCTTG
pHE13/T7-Rev	RNAi	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCG GCAAAGCTGGCAAAGCAG
UNI-T7TAG *	RNAi, <i>in situs</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTGGCGCCCC TAGATG
T7TAG-9*	RNAi, <i>in situs</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTGAGGTACG CGTGGG
CG10349/For-T7	<i>in situs</i> Sonde 11	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCG GATGTGGTTTGGTAGCTCTC
CG10349/Rev-T3	<i>in situs</i> Sonde 11	GCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGGGGGC AATACAAATAATTTGTAATCA
BX-C/contr- ForT7	<i>in situs</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCA ATTAGTGTCAGTGGCAAAGAC
BX-C/contr- RevT3	<i>in situs</i>	GCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGGCGCA ATTAACCCTCACTAAAGGG
Fab7pRev/T7	<i>in situs</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGG CGCGTTGATATGCCCCAATGTT
Fab7pRev2/T7	<i>in situs</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCC ATGGTATTTTATGCTTAGTCGGGTG
Fab7pFor1/T3	<i>in situs</i>	GCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGTTCAC ACTCATAACCGTAGGCAAGTAT
E9-T7For	DROSO1 E9, <i>in situs</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC CTAGGGGTGGTTAGTGAGAGC
E9-T3Rev	DROSO1 E9, <i>in situs</i>	GCGCAATTAACCCTCACTAAAGGG GGAATATCTAGTGCCCGCATG
E8-17-T7For	<i>in situs</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC CCAGGGGAGTCTCATGTATAA
E8-17-T3Rev	<i>in situs</i>	GCGCAATTAACCCTCACTAAAGGG TCACGAGCGTGAGTTATGGTT
E30+40-T7For	<i>in situs</i> Sonde 15	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC CAATTCTAACCAGACAGCTG

Primer	Verwendungszweck	Sequenz
E30+40-T3Rev	<i>in situ</i> Sonde 15	GCGCAATTAACCCTCACTAAAGGG CCTTGGTATGGGTGCCTGCT
C15-T7For	<i>in situ</i> Sonde 13	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC TCATCAAGCGTTACTCTGGCT
C15-T3Rev	<i>in situ</i> Sonde 13	GCGCAATTAACCCTCACTAAAGGG TAGTGCCGCTAATAAGTAGCC
btx 000028R28*	DROSO1 C4 Sonde 1	GCCAGTGCACGTACAGATGAAA
btx 000028S28*	DROSO1 C4 Sonde 1	TGACTTTCTTGGGTTTTCTCTTTT
btx000049R49*	DROSO1 E1 Sonde 2	CCTGTCCCTGCGGGAAATC
btx000049R49*	DROSO1 E1 Sonde 2	CCCGTTTGACAACAAAATGTATGT
btx00060R60*	DROSO1 E12	TCAAATAATGAAAAAGCTGTAACCTT
btx00060S60*	DROSO1 E12	CAAGCTTCAAAAATAAATGTATCAAAT
btx00069R69*	DROSO1 F9 Sonde 3	GGGCATGGCTCAAGTGGAG
btx00069S69*	DROSO1 F9 Sonde 3	GCGACCTTGAGCCCGTAG
btx000084R84*	DROSO1 G12 Sonde 4	GGCAGCAATAAATTTGATCGAA
btx000084S84*	DROSO1 G12 Sonde 4	ATTTATATTTAACAATCTTGCATAAATCA
btx000085R85*	DROSO1 H1 Sonde 5	TTGATTTATGCAAGATTGTAAATATAA
btx000085S85*	DROSO1 H1 Sonde 5	TATGGAAAGCTATTTTATCTATAACTC
btx000086R86*	DROSO1 H2 Sonde 6	TATAGATAAAATAGCTTTCATAATTAAA
btx000086S86*	DROSO1 H2 Sonde 6	TATAAGCAAAGAGAGTTGGAAAGAG
btx000087R87*	DROSO1 H3 Sonde 7	TTCCAACCTCTCTTTGCTTATATTTA
btx000087S87*	DROSO1 H3 Sonde 7	CTCTATTCAAATGTGCGAAGTAAA
btx000088R88*	DROSO1 H4 Sonde 8	TTTACTTCGCACATTTGAATAGAG
btx000088S88*	DROSO1 H4 Sonde 8	CTCCTTAAAAAGTCACTTGAACG
btx000089R89*	DROSO 1 H5 Sonde 9	TTTCCGTTCAAGTGACTTTTTAAG
btx000089S89*	DROSO 1 H5 Sonde 9	CTGCCTGCTGGCCATTTTATT
btx000090R90*	DROSO1 H6 Sonde 10	GTCTCGCTCCTTGAATAAATAAA
btx000090S90*	DROSO1 H6 Sonde 10	ATATAACAGCTTCCAGATTTATTTATTTT

Primer	Verwendungszweck	Sequenz
btx000137R137*	DROSO 2 D5	CAGCGACGTCGACTTTGAC
btx000137S137*	DROSO 2 D5	AGCGCATACCAAATATGATACAA
btx000145R145*	DROSO2 E1(E30-40)	CAGAAGGGGAACGGCTCTC
btx000145S145*	DROSO2 E1(E30-40)	TTGACATTATATTTACAATAGCAGAAA
btx000174R174*	DROSO 2 G6	CCAAAAGTCAACAAACAAGTCAAA
btx000174R174*	DROSO 2 G6	ATAAATCGTGGCTGCAATTGAGT
btx000186R186*	DROSO2 H6	TCATTTCTAATCCCTCGTTCCTT
btx000186S186*	DROSO2 H6	ACACCATCTATACATTAATAATGATAAAC
btx000192R192*	DROSO 2 H12	CTGGATTGGATCTGCTCGAAA
btx000192S192*	DROSO 2 H12	CCATCGGCATCCGATCCAA
btx000225R225*	DROSO3 C9 (pbx) Sonde 17	CTTGCAAAAGCGGCTATGAA
btx000225R225*	DROSO3 C9 (pbx) Sonde 17	CCTTCGTTCGATAAATTATGGTAAA

Freundlicherweise von M. Hild*, M. Prestel[§] und S. Schönfelder^Δ zur Verfügung gestellt

4.5 Antikörper

Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente Roche Diagnostics GmbH

4.6 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agarose ultra Pure	Gibco/BRL
Ammoniumsulfat	Merck
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin	Sigma
BCIP	Boehringer
BCIP/NBT Stocklösung	Roche
Borsäure	Merck
DEPC	Sigma
DTT	Merck
EDTA	Merck
EGTA	e. a. Thomas
Formaldehyd (37 %)	e. a. Thomas
Glycerin	Applichem
Glycin	Applichem
Hepes	Fluka
Heptan	Merck
Kaliumchlorid	Merck

Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
IPTG	Peqlab
Levamisol/HCl	Serva
Lithiumchlorid	Merck
NBT	Boehringer
Magnesiumchlorid	Merck
β -Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumhypochlorid	Roth
Natriumthiosulfat	Merck
Nipagin	Merck
Paraformaldehyd	Sigma
Pepstatin A	Sigma
PMSF	Serva
Propionsäure	Merck
Saccharose	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck
TEMED	Serva
Triton X-100	Merck
Tris	e. a. Thomas
Tween 20	Sigma

4.7 Zutaten für Fliegenfutter

Bacto-Agar	Difco
Fadenagar	Serva
Maismehl	Neuform International
Malzextrakt	Ulmer Spatz Diamalt
Rübensirup	Grafschafter
Sojamehl	Henselwerk
Trockenhefe	S.I.L. Lesaffre

4.8 Sonstige Geräte und Materialien

Flugkäfige für Fliegen	Feinmechanikwerkstatt des ZMBH
Horizontalschüttler Typ 3006	GFL - Gesellschaft für Labortechnik
Magnetrührer	Ikamag
Megascript High Yield Transcription Kit (für T7 und T3)	Ambion
Mikrowellengerät	Panasonic Dimension 4

PCR-Maschinen

pH-Meter

Oligotex mRNA Midi Kit

Plasmid Maxi Kit

QIAquick PCR Purification Kit

QIAquick Gel Extraction Kit

RNeasy Maxi Kit

Spannungsquellen

Thermomixer compact

Tischzentrifuge

Überkopfröhrer

Ultrazentrifuge

Vortex Genie

Wasserbad mit Haube

Zentrifuge

Stratagene Robocycler Gradient 96 und
GeneAmp System 9700 von Perkin Elmer

inoLab

Qiagen

Qiagen

Qiagen

Qiagen

Qiagen

EMBL Ps 143 und Biorad Power Pac 200

Eppendorf

Eppendorf Centrifuge 5417C

Heidolph

Beckman L8-M

Bender & Hobein AG

Eco Temp EW 12 von Julabo

Sorvall RC5C

5 Methoden

5.1 Elektroporation

Um die DNA in die Zellen einzuschleusen, bediente man sich eines starken elektrischen Feldes, das die DNA in die Zellen „zieht“.

Pro Transformationsansatz wurden 50 µl Zellen verwendet, die auf Eis aufgetaut und mit der DNA gemischt wurden. Diese Mischung wurde in eine gekühlte Küvette überführt und im Elektroporator einem Feld von 1250 V (für XL1-blue und TOP10 Zellen) ausgesetzt. Sofort danach wurde 1 ml LB oder SOC Medium (ohne Antibiotika) zugefügt und vermischt. Die Zellen wurden dann 1 Stunde bei 37°C inkubiert, damit die Expression der Resistenzgene beginnen konnte. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar Platten mit entsprechender Resistenz ausplattiert.

5.2 P-Element vermittelte Keimbahntransformation

5.2.1 Fliegenzucht und Haltung

Die Zucht und Haltung der Fliegen erfolgte bei 25 °C und 70 % Luftfeuchtigkeit in Polystyrolröhrchen (Höhe: 10 cm, Durchmesser: 5 cm), deren Boden bis zu einer Höhe von 4 cm mit Nährbrei bedeckt wurde.

Um eine möglichst große Anzahl gesunder Embryonen für die Transformation zu erhalten, wurden zur Eiablage Fliegen benutzt, die zwischen 3 und 7 Tage alt waren. Mehrere Tage vor der Eiablage wurden die Fliegen in frische große Röhrchen mit Nährbrei und viel Hefe umgesetzt. Die Haltung der zur Eiablage bestimmten Fliegen erfolgte bei 18 °C. Die Herabsetzung der Haltungstemperatur von 25 °C auf 18 °C führt zu einer Verlangsamung der Embryonalentwicklung um den Faktor 1,8. Für das Gelingen der Transformation ist dies von entscheidender Bedeutung, da nur Embryonen zur Injektion verwendet werden können, bei denen die Bildung der Polzellen noch nicht eingesetzt hat.

Die Bildung der Polzellen, die in *Drosophila* die Keimbahn konstituieren, setzt im Stadium 2 (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985) der Embryonalentwicklung ein. Im Falle der w^{1118} -Fliegen der vorliegenden Arbeit belief sich der Zeitraum bis zum Erreichen des Stadiums auf ca. 1 $\frac{3}{4}$ h. Demnach mussten sämtliche der nachfolgend beschriebenen Schritte in dieser Zeit vollzogen werden, um möglichst viele transformationskompetente Embryonen zu gewinnen.

Nährbrei:	8 l Wasser
	64 g Fadenagar
	144 g Trockenhefe

80 g Sojamehl
 176 g Rübensirup
 640 g Maismehl
 640 g Malzextrakt
 19,2 g Nipagin (Methyl-4-hydroxybenzoat; Merck)
 in Ethanol (95 %) gelöst
 Propionsäure; Volumen abhängig vom pH: 16,8 ml bei pH 5,
 61,2 ml bei pH 5,5, 105 ml bei pH 6.

Agar in kochendem Wasser lösen; alle Zutaten bis auf die Propionsäure und Nipagin zugeben, 10 min kochen lassen und umrühren. Den Brei solange (4 h) erhitzen, bis er homogen erscheint. Nach Abkühlen des Breis auf ca. 60 °C wird die Propionsäure zusammen mit Nipagin zugefügt und der fertige Brei in Polystyrolröhrchen (Greiner) portioniert. Nach Trocknung über Nacht werden die Futterröhrchen bei 4 °C gelagert.

5.2.2 P-Element vermittelte Transformation von *Drosophila*-Embryonen

A. Herstellung der Injektionslösung

Die präparative Aufreinigung der zu injizierenden DNA wurde mit dem Qiagen EndoFree Kit oder Qiagen Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde in Injektionspuffer (5 mM KCl; 0,1 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 6,8) aufgenommen und auf eine Konzentration von 375 ng/ml eingestellt. Dabei entfiel auf die Vektor-DNA ein Anteil von 300 ng/ml und auf die Transposase-kodierende Helfer-DNA (pUCHsD2-3) 75 ng/ml.

B. Arbeitsplatz für die Mikroinjektion

Die Ablagen und die Vorbereitung der *Drosophila*-Embryonen erfolgte in einem klimatisierten Raum bei einer Temperatur von 18-21 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-70 % (siehe 5.1.5).

C. Beladung der Injektionsnadel

Um die Gefahr des Verstopfens der Injektionsnadel durch Verunreinigungen wie Fusseln und Staubpartikel zu reduzieren, wurde die Injektionslösung vor der Befüllung der Injektionsnadel für 10 min mit 12.000 Upm bei 4 °C zentrifugiert. Unmittelbar nach der Zentrifugation wurden 2-4 µl der Injektionslösung mit einer autoklavierten Mikroloader-Pipettenspitze (Eppendorf) der obersten Schicht des Zentrifugats entnommen, ohne die pelletierten Fusseln

und Partikel aufzuwirbeln. Die gefüllte Mikroloader-Pipettenspitze wurde von hinten möglichst weit in die Injektionsnadel (Femtotips, Eppendorf) eingeführt und die Injektionslösung, ohne Luftbläschen zu erzeugen, entlassen.

Die gefüllte Injektionsnadel wurde vorsichtig mit dem der Nadelspitze gegenüberliegenden Kunststoffgewinde in den Kapillarenhalter (Eppendorf) eingeschraubt. Um das Eintrocknen der Nadelspitze durch austretende Injektionslösung zu verhindern, wurde die Nadelspitze in einen Tropfen Voltalef 10S-Öl auf einem Deckglas (40 x 18 mm) gelagert. Eventuell in der Nadelspitze vorhandene Luftbläschen konnten durch Druckluftstöße ausgetrieben werden.

D. Eiablagen, Sammeln und Waschen der Embryonen

Zur Ablage wurden die Fliegen in einen Ablagekäfig (9 cm Durchmesser, 12 cm Höhe) transferiert. Die Ablage der Eier erfolgte auf Apfelsaftagarplatten, die zur Anregung der Eiablage mit etwas Hefe versehen war. Alle 30-45 min wurden die Eier bzw. Embryonen mit einem Pinsel geerntet und in einem Körbchen mit Wasser gesammelt. Das Körbchen bestand aus der oberen Hälfte eines in der Mitte durchtrennten Szintillationsgefäßes, dessen untere Öffnung mit einem Gazestückchen verschlossen wurde; der Deckel des Szintillationsgefäßes wurde abgetrennt. Um eventuell anhaftende Hefezellen zu entfernen, wurden die im Körbchen befindlichen Eier gründlich mit H₂O abgespült. Noch im Körbchen vorhandenes Wasser wurde durch Abtupfen der Körbchenunterseite mit Zellstoff entfernt. Als nächstes erfolgte die Dechorionisierung der Embryonen.

Apfelsaftagar:	300 ml Wasser
	10 g Bacto-Agar
	100 ml Apfelsaft
	10 g Zucker

Bacto-Agar in Wasser in einem Mikrowellenherd bis zur Auflösung des Agars erhitzen. Zucker und Nipagin in Apfelsaft bei 60 °C lösen. Beide Lösungen wurden durch Rühren auf einem Magnetrührer vermischt und in Petrischalen (Ø 9 cm) abgefüllt.

E. Dechorionisierung der Embryonen

Die Dechorionisierung der Embryonen wurde mittels Bleiche (2,4 % Natrium-hypochlorit-Lösung) für 2-3 min durchgeführt. Das Ausmass der Dechorionisierung wurde mittels einer Stereolupe bei 20-40 facher Vergrößerung kontrolliert. Als Anhaltspunkte einer vollständigen Dechorionisierung diente dabei die Entfernung der am anterioren Pol gelegenen dorsalen

Atmungsanhänge („dorsal appendages“) und das Aufschwimmen der dechorionisierten Embryonen an die Oberfläche der Bleiche. Anschließend wurden noch vorhandenen NaClO-Reste durch Abtupfen des Körbchens auf Zellstoff und ausgiebigem Spülen der dechorionisierten Embryonen mit H₂O entfernt. Bis zum nächsten Schritt wurden die Embryonen in H₂O aufbewahrt.

Zur Injektion werden nur Eier bzw. Embryonen verwendet, die im H₂O aufschwimmen. Folglich stellt dieser Schritt eine Qualitätskontrolle dar.

F. Anordnung der Embryonen auf ein Deckgläschen

40-70 dechorionisierte Embryonen wurden mit einer Präpariernadel vorsichtig in einer Reihe auf einen Apfelsaftagar-Streifen (0,5 cm x 4 cm) innerhalb von 10-15 min angeordnet. Die am anterioren Pol gelegene Mikropyle der Embryonen soll dabei dem Experimentator zugewandt sein. Embryonen die zu alt oder beschädigt waren, wurden bei diesem Schritt entfernt. Die Feuchtigkeit der Apfelsaftagar-Streifen verhinderte die Austrocknung der Embryonen.

Die angeordneten Embryonen auf ein Deckgläschen (18 mm x 40 mm) transferiert, dessen eine 40 mm-Längsseite mit doppelseitigem Klebeband (Scotch 665) versehen war. Die Embryonen wurden hierfür mit dem Klebeband von der Oberfläche des LB-Agarstreifens behutsam abgehoben. Die Mikropyle zeigte nun zur Deckglasmitte, wohin gegen der posteriore Pol in einem Abstand von 0.5-1 mm zum Deckglasrand dem Experimentator zugewandt war.

G. Dehydrierung der Embryonen

Vor der Injektion wurden die Embryonen für 5-7 min in einer mit Silikagel gefüllten Trockenkammer dehydriert. Der Trocknungszustand der Embryonen wurde mit einer Stereolupe kontrolliert. Unverzüglich nach der Dehydrierung wurden die Embryonen mit Voltalef 10S-Öl überschichtet, um ein weiteres Austrocknen zu verhindern.

H. Injektion der dechorionisierten und dehydrierten Embryonen

Die Injektion erfolgte bei einer Raumtemperatur von 18°C. Jede Nadel wurde mit 2-5 µl DNA-Lösung beschickt. Die Injektion der Embryonen erfolgte innerhalb von 5-10 min. Das Injektionsvolumen wurde möglichst gering gehalten, um ein Auslaufen der Embryonen zu verhindern.

Die Injektion erfolgte mit einem Druck (P2) von 180-300 hPa für 0,5-0,8 s. Die Druckluft wird durch einen Kompressor (Jun-Air) bereitgestellt, der einen Druck von 2780 hPa im Mikroinjektionsapparat aufrechterhält. Im Mikroinjektionsapparat wird der Druck von 2780 hPa auf die oben angegebenen Injektionsdrücke von 180-400 hPa gesenkt. Zu alte oder beschädigte Embryonen wurden durch kurzzeitiges Anlegen eines Drucks von ~100 hPa zum Platzen gebracht. Mit Hilfe des Eppendorf-Mikrosoinjektors 5242 konnte zwischen den Injektionen durch Anlegen eines Drucks von 60 hPa (P3) ein kontinuierlicher DNA-Fluss aufrechterhalten werden, der ebenfalls dazu beitrug, der Verstopfung der Nadel entgegenzuwirken.

I. Behandlung der Fliegen nach der Injektion

Nach der Injektion wurde das Deckgläschen samt injizierten Embryonen auf einem Objektträger mittels eines Tropfens Voltalef 10S-Öl befestigt und in feuchten Kammern 2-3 Tage bei 18 °C bis zum Schlüpfen der Larven der G₀-Generation gelagert. Die feuchte Kammer bestand aus einer Petrischale (Ø 60 mm), deren Boden mit befeuchteten Papiertüchern ausgelegt war. Die geschlossenen Petrischalen wurden ihrerseits in eine größere feuchte Kammer gestellt, deren Boden ebenfalls mit befeuchteten Papiertüchern ausgelegt war.

Die geschlüpften Larven wurden vorsichtig mittels einer Präpariernadel in einem Tropfen Voltalef 10S-Öl in ein Futterröhrchen mit frischer Hefe überführt. In diesen verblieben sie 10-12 Tage bei 25 °C bis zum Schlüpfen der Adulttiere der G₀-Generation.

Kompressor (Jun-Air)

Mikroinjektor 5242 (Eppendorf)

Mikromanipulator (Leitz, Stuttgart)

Mikroskop Labovet (Leitz)

Stereomikroskop (Wild, Herbrugg in der Schweiz)

Kaltlichtleuchte KL 1500 (Schott)

Eppendorf-Femtotips

Eppendorf-Mikroloader Plastikspitzen; diese wurden vor Gebrauch autoklaviert.

Doppelseitiges Klebeband (Scotch 665)

Stereomikroskop (Wild, Herbrugg in der Schweiz)

Kaltlichtleuchte KL 1500 (Schott)

Voltalef 10S-Fluorocarbonöl

5.2.3 Etablierung transformierter homozygoter *Drosophila*-Linien

Nach 10-12 Tagen schlüpften aus den injizierten Embryonen die Adulttiere der sog. G₀-Generation. Der erste Schritt zur Etablierung stabil transformierter homozygoter *Drosophila*-Linien bestand darin, jedes G₀-Adulttier einzeln mit Fliegen des Wirtsstammes w¹¹¹⁸ zu kreuzen. Jedes G₀-Männchen wurde mit 3-4 virginellen w¹¹¹⁸-Weibchen gekreuzt bzw. jedes virginelle G₀-Weibchen mit 3-4 w¹¹¹⁸-Männchen. Diese Kreuzung ist notwendig, da die P-Element-DNA fast ausschließlich in die Kerne der künftigen Keimzellen der injizierten w¹¹¹⁸-Embryonen aufgenommen wird, und folglich der Phänotyp der G₀-Adulttiere keine Hinweise auf eine erfolgreiche Transformation geben kann. Die Kreuzungen fanden in Polystyrolröhrchen mit einer Höhe von 64 mm und einem Durchmesser (Ø) von 26 mm statt, die in einem Brutschrank bei 25 °C aufbewahrt wurden.

10-12 Tage nach Ansetzen der Einzelpaarkreuzung konnten die Adulttiere der nächsten Generation, der sog. G₁-Generation, auf heterozygote Transformanten untersucht werden. Dazu wurden die G₁-Fliegen mit CO₂ betäubt und die Färbung ihrer Augen mit einer Stereolupe überprüft. Da als Wirtsstamm w¹¹¹⁸-Fliegen fungierten und der für die Transformation benutzte P-Element-Transformationsvektor das mini-*white* Gen als Marker trägt, konnten die noch heterozygoten Transformanten an den pigmentierten Augen erkannt werden. Die Intensität der Färbung reichte, je nach Stamm, von einem kaum wahrnehmbaren gelb über variegierende Musterung bis zu homogenem dunkelrot.

Um Fliegen zu erhalten, die in ihrem Genom nur eine Kopie des transformierten P-Elements samt rekombinanter DNA tragen, sog. „single insert“-Linien, wurden die heterozygoten transformanten G₁-Fliegen ein zweites Mal mit w¹¹¹⁸-Fliegen gekreuzt. Die daraus hervorgehenden G₂-Nachkommen wurden untereinander gekreuzt, um homozygote transformante Linien zu etablieren.

Die homozygoten Transformanten wurden zur Vermehrung in Polystyrolröhrchen (Höhe: 100 mm; Ø: 53 mm) gehalten.

Polystyrolröhrchen	Höhe: 64 mm; Ø: 26 mm (Greiner)
	Höhe: 100 mm; Ø: 53 mm (Greiner)

5.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

5.3.1 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion wurde in zahlreichen Experimenten benutzt. Die PCR Produkte dienen der Herstellung von Klonierungsfragmenten (z.B. TOPO-TA Klonierung), von Matrizen zur *in vitro* Transkription und zum Nachweis bestimmter Nukleinsäuren und Sequenzen an sich.

Für einen 100 μ l Standard-Ansatz wurden gemischt:

10x PCR Puffer	10 μ l
NTP mix (jeweils 2,5mM)	1 μ l
Primer 1(100 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer 2 (100 pmol/ μ l)	1 μ l
DNA Matriz	1-100 ng
Taq-Polymerase	1u
H ₂ O	ad 100 μ l

Die PCR erfolgte unter jeweils an die Schmelztemperatur der Primer angepassten Bedingungen. Die Dauer der Elongation (Inkubation bei 72°C) hängt dabei von der Länge der zu amplifizierenden DNA ab. Für die Taq Polymerase gilt als Faustregel 1 min/1kb.

Fenster 1: 1 Zyklus:

3 min	94°C
30-60 sec	50-68°C
1-3 min	72°C

Fenster 2: 25-35 Zyklen:

30-45 sec	94°C
30-60 sec	50-68°C
1-3 min	72°C

Fenster 3: 1 Zyklus:

30-45 sec	94°C
30-60 sec	50-68°C
10 min	72°C

5 μ l oder mehr eines jeden PCR Ansatzes wurden anschließend mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Aufreinigung von PCR Produkten erfolgte mit Qiagen PCR Spin Columns.

5.3.2 RT-PCR

Für die reverse Transkription wurde das "cDNA Cycle Kit for RT-PCR" von Invitrogen benutzt. Wahlweise wurden Oligo dT, "Random" (zufällige) oder spezifische Primer benutzt. Die genomische DNA wurde jeweils vollständig mit DNase verdaut.

5.4 Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität in Embryonen

Zum Sammeln von Embryonen für den Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität wurden ungefähr 100 Fliegen angesetzt, für drei Tage in großen Röhrchen gehalten und dann in Flugkäfige umgesetzt. Die Ablage erfolgte über Nacht bei 18°C auf Apfelsaftagarplatten, die am nächsten Tag ausgewechselt und für weitere 4 Stunden bei 18°C inkubiert wurden, da der verwendete Hitzeschockpromotor erst aktiv ist, wenn die Embryonen sich bereits 3-4 Stunden entwickeln konnten. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 45-60 Minuten bei 37°C im geschlossenen Wasserbad. Nach einer Erholungsphase von 1-3 Stunden, die Zeit für die Expression der Proteine gewährte, erfolgte die Dechorionisierung für 3 min mit Natronbleiche. Dazu wurden die Embryonen mit Wasser und einem Pinsel von der Platte gewaschen und in einen Siebchen gesammelt. Nach einem kurzen Waschschriff mit PBS wurde die Fixierung für 10 min mit Fixierlösung durchgeführt, erneut gewaschen, kurz getrocknet und die Embryonen in Färbelösung überführt. Die Färbung geschieht über mehrere Stunden oder über Nacht bei 37°C in silikonisierten Eppendorfröhrchen, um ein Kleben der Embryonen an der Gefäßwand zu vermeiden. Am nächsten Morgen wurde die Reaktion durch Absaugen der Färbelösung und Waschen mit PBS abgestoppt und die Embryos in 80 % Glycerol auf Objektträgern eingebettet. Um das Austrocknen möglichst zu verhindern, wurden die Ränder des Deckgläschens mit klarem Nagellack abgedichtet. Alle Schritte wurden unter der Stereolupe kontrolliert.

Fixierlösung: 5 ml Heptan
 0,9 ml 25 % Glutaraldehyd
 0,1 ml 1 M Phosphatpuffer (pH 7)
 \Rightarrow gut mischen und obere Phase zur Fixierung verwenden

Färbelösung: 10 mM Phosphatpuffer(pH7)
 150 mM NaCl
 1 mM MgCl_2
 6 mM $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$
 6 mM $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$
 0,3 % TritonX-100
 \Rightarrow 5 min bei 37°C inkubieren
 0,2 % X-Gal (in DMSO)
 \Rightarrow 5 min bei 37°C inkubieren und 3 min bei 13000 Upm zentrifugieren

5.5 RNA Interference (RNAi)

5.5.1 *In vitro* Transkription und Herstellung von dsRNA

A. Hybridisierung komplementärer RNA Stränge zu Doppelstrang RNA (dsRNA)

Äquimolare Mengen komplementärer ssRNA, gelöst in Injektionspuffer, wurden in einem RNase freien Reaktionsgefäß gemischt und in ein 1-Liter-Becherglas gefüllt mit kochendem Wasser gestellt. Das Becherglas soll mit den Proben über Nacht (jedoch nicht weniger als 18 Stunden) langsam auf RT abkühlen. Während der Abkühlung können die komplementären RNA-Stränge stabile Basenpaarungen eingehen.

B. Herstellung von dsRNA während der *in vitro* Transkription

Alternativ zur in A. beschriebenen Vorgehensweise kann auch ein mittels PCR hergestelltes , jedoch RNase freies DNA Template zur *in vitro* Transkription dienen, das T7 Promotoren an jeweils beiden Enden trägt. Die T7 Polymerase schreibt die Matritze von beiden Enden ab, wobei sich unmittelbar dsRNA bildet, die nicht erst noch hybridisiert werden muss. Zur *in vitro* Transkription wurde das MEGAscript™ Kit von Ambion verwendet. Nach der Isopropanol-Fällung wurde die dsRNA in Injektionspuffer aufgenommen, die Konzentration bestimmt und durch Verdünnung auf 5 µM eingestellt, welches der dsRNA Konzentration zur Injektion entspricht.

C. Qualitätskontrolle der dsRNA

Die dsRNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt, ausgehend der Kalkulation:

$$\text{OD}_{260} \cdot 1 = 50 \mu\text{g/ml}$$

Um die Endkonzentration von 5 µM dsRNA zu erreichen, wird jede Probe mit der entsprechenden Menge RNase-freiem Injektionspuffer verdünnt.

Anschließend werden 1-2 µg dsRNA auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt, um zu kontrollieren, ob die RNA als dsRNA mit der erwarteten Größe vorliegt. Die dsRNA kann bei -80°C gelagert werden.

5.5.2 RNAi in *Drosophila* Embryonen

Die dsRNA des zu untersuchenden Gens wird mittels Mikroinjektion in den Embryo eingebracht. Die Konzentration liegt bei 5 µM. Im Unterschied zu P-Element vermittelten Keimbahntransformation (siehe Kap. 5.2.5) sind die injizierten Embryonen hier eine Stunde alt und

werden bei 25°C abgelegt. Im Übrigen gleicht der Versuchsablauf dem in Kap. 5.2 beschriebenen.

5.5.3 Kutikula Analyse der dsRNA injizierten Embryonen

Die auf dem Klebestreifen angeordneten Embryonen wurden, in den auf die Injektion folgenden 24-48 Stunden, unter der Stereolupe genauestens auf Abnormalitäten ihrer Kutikula untersucht. Embryonen mit Phänotyp wurden sehr vorsichtig mit einer Präpariernadel oder einem Skalpell vom Klebeband gelöst. Hierfür musste die Vitellinmembran zerstört werden. Die Embryonen werden in ein Eppendorfgefäß mit PBT (PBS/ 0,5% Triton X-100) überführt und gewaschen. In Glyzerin/Eisessig (1:4) erfolgte die Fixierung über Nacht bei 60°C. Nach Entfernen der Fixierlösung wurden die Präparate mit wenig Fixierlösung auf einem Objektträger transferiert. Mit Zellstoff entfernte man die restliche Fixierlösung und bettete die Embryonen in Hoyers Medium. Das ganze wurde mit einem Deckglas abgeschlossen und zum Klären über Nacht bei 65°C gelagert. Zur mikroskopischen Analyse der Präparate nutzte man das Dunkelfeld.

5.6 *In situ* Hybridisierung zur Lokalisierung spezifischer RNAs in *Drosophila* Embryonen

A. Fixierung der Embryonen

Die in Fliegenkäfigen auf Apfelsaftagarplatten gelegten *Drosophila*-Eier wurden vorsichtig mit einem Pinsel und Eiwaschlösung gelöst und in Waschkörbchen überführt. Nach gründlichem Spülen mit Eiwaschlösung wurden die Embryonen in 3 % Chlorbleiche 3 min dechorionisiert und anschließend gründlich mit Wasser abgespült. Die Gaze mit den Embryonen wurde aus dem Waschkörbchen herausgeschraubt und in ein Szintillationsgefäß mit 4 ml Fixierlösung (10% Paraformaldehyd in PBS; 50 mM EGTA, pH 7/HCl) überführt. Hierzu pipettierte man 5 ml Heptan, wobei sich die dechorionisierten Embryonen von der Gaze lösten und zu Boden sanken. Die Fixierung erfolgte bei heftigem Schütteln für 20 min. Nun wurde die untere Phase entfernt und 10 ml oder wenn nötig mehr Methanol zugegeben. Nach heftigem Vortexen (20 sec) sanken die Embryonen zu Boden. Schließlich wusch man die Embryonen noch solange mit Methanol, bis jegliche Trübung der Lösung verschwunden war. Nun konnten die Embryonen bei -20°C mehrere Wochen aufbewahrt werden.

B. RNA-Markierung mit Digoxigenin-UTP mittels *in vitro* Transkription

Zur Herstellung Digoxigenin (DIG) markierter RNA wurde der DIG RNA labeling Mix, 10x konzentriert von Roche eingesetzt. Wahlweise wurde mit T7- oder T3-Polymerase von Roche transkribiert. Aufgereinigt wurde die markierte RNA über PCR Spin columns von Qiagen. Die DIG markierten RNAs können mit einem Schnelltest auf die Quantität des UTP Einbaus überprüft werden.

Hierbei wird eine Verdünnungsreihe der markierten Nukleinsäure auf einen Teststreifen (Nylonmembran) aufgetragen (jeweils 1 µl), 2 min getrocknet und auf beiden Seiten mit dem Stratalinker (Stratagene) auto-UV-kreuzhybridisiert. Die Detektion erfolgt wie in Punkt 5.9.3 A (Hybridisierung DIG markierter RNA Sonden an Northern und Slot Blots).

C. *In situ* Hybridisierung

Die fixierten Embryonen wurden nochmals mit Methanol gewaschen, dann einmal mit einem Methanol/PBT (1:1) Gemisch gespült. Zugleich wurden die Embryonen in silikonisierte Eppendorfgläser überführt. Die Embryonen sanken nach jedem Wachschriff langsam zu Boden. Alle Wasch- und Inkubationschritte wurden auf dem Überkopffrotierer durchgeführt. Die anschließende Fixierung erfolgte in Fixierlösung/PBT (1:1) für 20 min. Mit PBT wurde anschließend dreimal gespült und einmal für 5 min gewaschen. Um die Embryonen durchlässig für Sonden, Antikörper und Farbstoffe zu machen, wurden sie 3 min mit Proteinase K verdaut (0,5 µl Proteinase K (50 mg/ml) in 0,5 ml PBT). Die Reaktion wurde mit einer Lösung aus 4 mg/ml Glycin/PBT 3 min lang abgestoppt. Nach weiteren zwei Spülschritten mit PBT folgte die 20 minütige Fixierung in Fixierlösung/PBT (1:1). Nach dreimaligem Spülen und 5 min Waschen in PBT wurden die Embryonen kurz mit 500 µl HybeB-Lösung/PBT (1:1) inkubiert. Diese Lösung wurde zuerst durch 250 µl HybeB ersetzt und schließlich durch 250 µl Hybe-Lösung. Die anschließende Prähybridisierung in 250 µl Hybe-Lösung fand für 30-60 min bei 65°C im Wasserbad statt.

Parallel zur Präinkubation wurden die Sonden zur Hybridisierung vorbereitet. Gewöhnlich genügt 1 µl der DIG markierten RNA. Die Sonde wurde in 30 µl Hybe-Lösung für 10 min bei 65°C denaturiert. Nach der Prähybridisierung entfernte man die Hybe-Lösung und gab die Hybridisierungslösung mit der RNA-Sonde zu.

Die Hybridisierung erfolgt bei 65°C über Nacht im geschlossenen Wasserbad.

Am nächsten Tag pipettierte man zu den Embryonen weitere 500 µl 65°C warme Hybe-Lösung und ersetzte sie nach dem Absinken der Embryonen durch 500 µl 65°C warme HybeB-Lösung. Die folgende 15 minütige Inkubation erfolgte ebenfalls bei 65°C im Wasserbad. Letzterer Schritt wiederholte sich einmal bevor 500 µl PBT zugegeben wurden. Es folgten zwei Spülungen und drei Waschschriffe à 5, 10 und 20 min mit PBT.

D. Präabsorption der Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente

200 μ l fixierte Wt Embryonen, die wie in Punkt (*in situ* Hybridisierung) beschrieben mit Proteinase K behandelt und fixiert waren, wurden mit ca. 2 ml PBT und entsprechender Konzentration an Fab-Fragmenten für eine Stunde bei RT inkubiert. Die korrekte Endkonzentration der Antikörper (1:2000) wurde im Anschluss durch Verdünnen mit PBT eingestellt.

E. Detektion der *in situ* hybridisierten RNAs

Die gewaschenen Embryonen wurden nun mit präabsorbierten Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente (Roche) (1:2000 in PBT) 1,5 Stunden inkubiert. Der Antikörper war mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert. Weitere Waschschritte folgten: zweimal spülen und jeweils 5, 10 und 15 min mit PBT waschen. Zur colormetrischen Detektion der DIG markierten Sonden benutzte man das BCIP und NBT Redoxsystem. Eine NBT/BCIP Stocklösung (18,75 mg/ml NBT und 9,4 mg/ml BCIP in 67 % DMSO v/v; Roche) wurde 1:50 in AP Puffer verdünnt und zu den Embryonen gegeben. Die Färbereaktion wurde beispielsweise in 16-well Platten oder in Eppendorfreaktionsgefäßen im Dunkeln durchgeführt und in regelmäßigen Abständen überprüft. Nach genügend starker Färbung, ohne Hintergrundbildung, wurde die Reaktion durch zweimaliges Spülen und fünffaches Waschen für jeweils 5 min mit PBT abgestoppt. Zuletzt wurden die gefärbten Embryonen zweimal 5 min mit 70 % Ethanol gewaschen und schließlich in 100 % Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Zur Betrachtung unter dem Mikroskop wurden die Präparate in 70 % Glycerin in PBS auf einem Objektträger eingebettet.

5.7 Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren aus *Drosophila melanogaster*

5.7.1 Isolierung von genomischer DNA

Isolierung genomischer DNA aus adulten Fliegen wurde anhand des Protokolls von Ish-Horowicz aus „A laboratory manual“ (Ashburner, 1989) durchgeführt. Dabei wurden 200 Fliegen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einem vorgekühlten Homogenisator der Größe A in 5 ml Homogenisierungspuffer vorsichtig auf Eis zermahlen. Die Chitinpanzer der Fliegen wurden von den freigesetzten Zellen und Zellkernen durch 1 min zentrifugieren bei 1000 rpm in der Tischzentrifuge getrennt. Der Überstand wurde weitere 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert, das Sediment in 0,5 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen und mit Proteinase K versetzt (100 mg/ml). Nach Zugabe von 50 μ l 10 % SDS und gutem Mischen, wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Phenolextraktion mit anschließender Ethanolfällung, wobei die genomische DNA als DNA-Knäul in Erscheinung trat. Diese konnte mit einer Pinzette entnommen und in 70 % Ethanol gewaschen, dann ge-

trocknet und in kleinem Volumen TE aufgenommen werden. Für Restriktionsverdaus dieser DNA wurde noch RNase (DNase-frei) zugefügt, um die noch enthaltene RNA zu entfernen.

Homogenisierungspuffer: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
60 mM NaCl
10 mM EDTA
0,15 mM Spermin
0,15 mM Spermidin
auf 20 ml H₂O

5.7.2 Isolierung von RNA

A. Aufreinigung von Total RNA

Zur Aufreinigung von Gesamt-RNA aus *Drosophila* Embryonen, Larven und Adulten wurde das S.N.A.P.TM Total RNA Isolation Kit von Invitrogen benutzt. Tiere im gewünschten Entwicklungsstadium werden dabei zunächst mit dem Lysepuffer mit einem B-Pistill im Homogenisator aufgeschlossen. Es wurde ständig auf Eis gearbeitet und bei paralleler Herstellung mehrerer Proben wurden diese nach dem Homogenisieren in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, bis sie weiterbearbeitet wurden.

Alternativ wurde das RNeasy Maxi Kit von Qiagen genutzt.

B. Aufreinigung von poly-A⁺ RNA

Zur Gewinnung von polyadenylierter mRNA wurde die Total RNA (siehe oben) mit dem Qiagen Oligotex mRNA Kit weiter aufgereinigt. Die mRNA bildet ca. 1 % der Gesamt RNA, somit wurde teilweise bis zu 1 mg Total RNA eingesetzt. Wahlweise wurde auch das Messagemaker Reagent Kit von Gibco verwendet.

5.8 Primer Extension

Um das 5' Ende einer RNA nachzuweisen, benutzte man einen radioaktiv endmarkierten Oligoprimer, der unter Zugabe von Puffer und „kalten“, d.h. nicht radioaktiv markierten, Desoxynukleotiden durch eine reverse Transkriptase einen cDNA Strang synthetisierte. Das Oligo war einem kleinen Abschnitt aus dem transkribierten DNA Stranges komplementär und sollte möglichst nahe (100-200 Nukleotide) an der vermuteten Startstelle der RNA liegen. Eine parallel durchgeführte Sequenzierung erlaubt die direkte Zuordnung der gefundenen

RNA 5' Enden oder ein endmarkierter DNA Größenmarker ermöglicht eine etwaige Abschätzung der cDNA.

A. Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden

Die folgenden Reagenzien wurden in aufgelisteter Reihenfolge zusammenpipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert:

12 µl	H ₂ O
2 µl	10x T4 Polynukleotid Kinasepuffer (Roche)
1 µl	Oligoprimer (50-100ng)
3 µl	(30 µCi) $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP
2 µl	T4 Polynukleotidkinase (Roche)

Die Aufreinigung erfolgte mit Micro Bio-Spin® P-30 Tris Chromatography Columns von Bio-Rad

B. Radioaktive Endmarkierung eines DNA Größenmarkers

250 µg DNA Größenmarker (5 µl) werden mit 1 µl T4 PNK 10x Puffer, 3 µl (30 µCi) [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP und 1 µl T4 PNK (8-10 u/µl) bei 37°C für 10 min inkubiert. Die T4 PNK wird bei 90°C 2 min hitzeinaktiviert und 190 µl Wasser zugefügt. 1 µl davon genügt, um auf einem denaturierendem Polyacrylamidgel ein starkes Signal für die Autoradiographie zu erhalten.

C. Hybridisierung

25-50 µg gesamt RNA werden mit 100 000 cpm radioaktiv endmarkiertem Oligo (1-5 µl) vermischt. Das Gesamtvolumen wurde mit Wasser auf 50 µl erhöht und einer Natriumacetat/Ethanol-Fällung unterzogen. Das Pellet löste man in 15 µl Hybridisierungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 150 mM KCl) und erhitzte es für 5 min auf 90°C. Nun folgt nach kurzem Abzentrifugieren die 90 minütige Inkubation zur Hybridisierung. Die Hybridisierungstemperatur berechnete sich aus folgender Formel:

$$T_H = 78 + 0,4 (\%G+C) + 16,6 \log [K^+] - 800/n$$

(n ist die Länge des Nukleotids und $[K^+]$ die molare Konzentration von K^+)

Nach einer anderen Methode mit unterschiedlichem Puffer konnte man das Pellet auch in 30 µl Hybridisierungspuffer (40 mM PIPES pH 6,4; 1 mM EDTA pH 8; 0,4M NaCl; 80 %

Formamid) lösen und für 10 min auf 85°C erhitzen. Nun erfolgte nach kurzem Abzentrifugieren die Übernacht-Inkubation zur Hybridisierung bei 30 °C. Im Anschluss einer weiteren Ethanolfällung löste man das Oligo-RNA-Hybrid in 16,5 µl Wasser und fügte 2 µl 10x Puffer für AMV-RT (Reverse Transkriptase aus Avian Myeloblastosis Virus), 1 µl Enhanced AMV-RT (20 u/µl) und 0,5 µl RNase Inhibitor dazu. Die Inkubation bei 55°C dauerte 1 Stunde. Bei regulärer AMV-RT fand die Reaktion bei 42°C statt.

Zum Verdau der nun nicht mehr benötigten Gesamt-RNA gibt man 1 µl 1 mg/ml RNase A, sowie 1 µl 500 mM EDTA zu und inkubiert 30 min bei 37°C. Aufgereinigt wurde der Reaktionsansatz mit der revers transkribierten radioaktivmarkierten DNA durch ein Ethanolfällung und eine Standard Phenol/Chloroform Extraktion.

D. Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die oben beschriebene und gefällte DNA wurde in 3 µl TE gelöst und mit 4 µl Sequenzgelauftragspuffer (98 % Formamid, 10 mM EDTA, 0,1 % Xylene Cyanol, 0,1 % Bromphenolblau) gemischt. Die Hälfte des Ansatzes wurde nach Aufkochen auf ein 6 % denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde durch einen Vorlauf von einer halben Stunde aufgewärmt. Die Auftrennung geschah bei 45 V/cm, 1700 V und 70 W und dauerte in der Regel ungefähr eine Stunde. Das Sequenzgel wurde nach den Vorgaben aus "Current Protocols in Molecular Biology" Unit 7.6 vorbereitet.

Mit Abschluss der Elektrophorese überträgt man das Gel auf ein Stück Whatman Papier und trocknet es für die Autoradiographie.

5.9 Blot-Analyse von Nukleinsäuren

5.9.1 Southern Blot

Zur Überprüfung integrierter P-Elemente wurde genomische DNA isoliert, mit Restriktionsenzymen verdaut und mittels eines Agarosegels aufgetrennt. Um die in Agaroseflachgelen aufgetrennten DNA Banden auf eine Membran zu transferieren, die dann anhand hybridisierter radioaktiver DNA-Sonden zur Analyse diente, wurde nach dem Verfahren nach Southern vorgegangen.

Dazu wurde das zu blottende Gel nach dem Gellauf 10 min in 0,2 M HCl gelegt, kurz mit Wasser gespült, 45 min in 1,5 M NaCl/0,5 N NaOH, einmal 30 min und noch einmal 15 min in 1M Tris (pH 7,4)/1,5M NaCl inkubiert. Als Träger wurde eine GeneScreen Plus-Membran vorbereitet. Diese wurde zunächst mit Wasser befeuchtet und dann 15 min in 20x SSC gelegt.

Zum Blotaufbau wurde eine Glasplatte über der Schale mit 20x SSC installiert, auf welcher der Southern-Blot aufgebaut wurde. Über die Glasplatte wurde ein großes Stück Whatman 3 MM-Papier gelegt, das beidseitig der Glasplatte in den Transferpuffer tauchte. Auf das Whatman-Papier wurde das, wie oben beschrieben behandelte Gel, mit der Gelunterseite nach oben zeigend, gelegt. Auf die Gelunterseite kam die benetzte Membran gefolgt von zwei Lagen Whatman-Papier. Darauf wurde eine ca. 10 cm dicke Lage aus Papierhandtüchern gelegt, die durch ihre Kapillarkräfte den DNA-Transfer vom Gel auf die Trägermembran ermöglichten. Zur Verbesserung des ganzen Aufbaus wurden die Papiertücher gleichmäßig mit einem ca. 500 g schweren Gewicht belastet. Der Transfer wurde stets $\bar{U}N$ durchgeführt. Nach dem Blotten wurde die Membran zum Denaturieren der DNA für 1 min in 1,5 M NaCl / 0,5 M NaOH gelegt und anschließend für 1 min in 1,5 M Tris (pH 7,4) / 1,5 M NaCl inkubiert. Nach dem Trocknen der Membran wurde diese 1x UV-auto-kreuzhybridisiert und 30 min bei 80 °C inkubiert.

Material: 20x SSC: 175,3 g NaCl / 27,6 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ / 7,4 g EDTA auf 1 l
 GeneScreen Plus Membran von Du Pont
 UV Stratalinker 1800 von Stratagene

5.9.2 Northern Blot

A. Denaturierende Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung isolierter RNA lud man die zu bestimmende Probe auf ein denaturierendes Formaldehydgel.

Um die Gelkammer von RNasen zu befreien füllt man sie für 10 min mit 3 % Wasserstoffperoxid. Alle weiteren Chemikalien und Zutaten sollten ebenfalls RNase-frei sein und gegebenenfalls vor dem Autoklavieren mit DEPC behandelt worden sein.

Für ein 200 ml 1 % Agarose Gel benötigte man 156 ml Wasser und 2 g Agarose. Nach Aufkochen und Lösen der Agarose kühlte man sie auf 65° ab und gab 40 ml 5x MOPS, pH 7 und 4 ml 37 % Formaldehyd zu. Nun wurde das Gel gegossen.

Die zu analysierende RNA (20 μ g Gesamt-RNA) wurde gefällt und in Probenpuffer in Lösung gebracht (4,5 μ l Wasser, 2 μ l 5x MOPS, 3,5 μ l 37 % Formaldehyd, erst nach dem Lösen fügte man 10 μ l Formamid zu). Die Probe wurde für 10 min auf 65°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Nun gab man 4 μ l Farbpuffer (30 % Ficoll; 0,01 % Bromphenolblau; 0,01 % Xylene Cyanol) zu. Die Elektrophorese fand bei 100 V in 1x MOPS statt (ca. 3 h).

B. Northern Blot

Vor dem Blotten des Gels wurde es fünf mal 3 min in destilliertem DEPC Wasser gewaschen und 1 h in 20x SSC inkubiert. Der RNA Transfer auf die Nylonmembran erfolgte mittels Kapillartransfer in 2x SSC über Nacht. Nach dem Blotabbau wurde die Membran zwischen Frischhaltefolie gelegt, einmal mit dem Stratalinker auto-kreuzhybridisiert und 1 h bei 80°C gebacken.

5.9.3 Slot Blot

Um die in Northern Blots auf Grund ihrer Länge oder Sekundärstruktur schwer analysierbaren RNAs näher zu charakterisieren, konnte man auf die Slot Blot Analyse ausweichen. Hier wurde die gewünschte Menge Total oder polyA⁺ RNA auf einen Nylonfilter übertragen ohne vorher auf einem Gel nach Größe aufzutrennen. Es handelt sich folglich vorrangig um den Nachweis der Existenz einer RNA. Die RNA wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 500 µl gebracht, 10 min denaturiert und dann rasch auf Eis abgekühlt. Die Proben werden in die vorbereitete Slot Blot Apparatur pipettiert und mittels der Vakuumpumpe auf die Membran übertragen. Je nach RNA Menge konnte dies bis zu 45 min dauern. Nach dem Blotabbau wurde die Membran wie beim Northern Blot auf Whatmanpapier zwischen Frischhaltefolie gelegt, einmal mit dem Stratalinker auto-kreuzhybridisiert sowie 1 h bei 80°C gebacken.

A. Hybridisierung DIG markierter RNA Sonden an Northern und Slot Blots

Die Membran wurde zunächst in einer Hybridisierungsflasche mit DIG Easy Hyb (Boehringer) bei 68°C mindestens eine Stunde vorhybridisiert. Die DIG Sonde wurde für 10 min gekocht, bevor man sie zu Prähybridisierungslösung gab, die dem gewünschten Endvolumen zur Hybridisierung entsprach. Die Konzentration der Sonde sollte letztendlich 50-100 ng/ml entsprechen. (Vgl. Boehringer Mannheim Protokoll „The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation“). Die Hybridisierung fand ebenfalls bei 68°C über Nacht statt. Die Membran wurde zunächst zweimal 15 min mit 2x Waschlösung (2x SSC, 0,1%SDS) bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich noch zweimal mit 0,5x Waschlösung bei 68°C gewaschen. Eventuell muss je nach Länge der Sonde die Waschtemperatur variiert werden. Zur Detektion der hybridisierten Sonden wurde nach dem Boehringer Mannheim Protokoll (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation (Kapitel 9: Detection of DIG-labeled Nucleic Acids) vorgegangen.

Die Exposition des Röntgenfilms dauerte zwischen 30 min und 3 Tagen.

B. Entfernen („Strippen“) von Nukleinsäuren auf einer Nylonmembran**„Strippen“ eines Northern oder Slot Blots**

Wichtig ist, dass Membranen, die erneut hybridisiert werden sollen, nach der ersten Hybridisierung stets befeuchtet waren. Um die hybridisierte DIG markierte RNA-Probe von der Membran zu entfernen, wurde diese in Wasser abgespült und 30 min bei 68°C in folgender „Stripping“-Lösung im Hybridisierungssofen inkubiert: 50 % Formamid; 50 mM Tris-HCl pH 8; 1 % (w/v) SDS. Danach wurde nochmals gründlich mit Wasser und zweimal mit 2x SSC gewaschen. Die Membran wurde danach unmittelbar in 2x SSC aufbewahrt oder sofort prähybridisiert, um sie später mit einer neuen Sonde zu hybridisieren. Das Entfernen von RNA-Sonden ist besonders schwierig und gelang oftmals nur teilweise, da die RNA Stränge eine sehr starke Bindung eingehen.

„Strippen“ eines Southern Blots

Um an Southern Blots hybridisierte radioaktiv markierte DNA Sonden zu entfernen, musste die Nylonmembran in 0,1x SSC/1 % SDS für 15 min gekocht werden. Danach konnten die Blots einer weiteren Hybridisierung dienen.

6 Literatur

- Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P. B., Reuter, G. und Jenuwein, T. (1999). Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier *Su(var)3-9* encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *Embo J* 18, 1923-38.
- Aasland, R., Gibson, T. J. und Stewart, A. F. (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends. Biochem. Sci.* 20, 56-9.
- Akam, M. (1989). Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell* 57, 347-9.
- Akasaka, T., van Lohuizen, M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A. und Koseki, H. (2001). Mice doubly deficient for the *Polycomb* Group genes *Mel18* and *Bmi1* reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. *Development* 128, 1587-97.
- Akhtar, A. und Becker, P. B. (2001). The histone H4 acetyltransferase MOF uses a C2HC zinc finger for substrate recognition. *EMBO Rep.* 2, 113-8.
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila*. A laboratory handbook (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Ashe, H. L., Monks, J., Wijgerde, M., Fraser, P. und Proudfoot, N. J. (1997). Intergenic transcription and transinduction of the *human β -globin locus*. *Genes Dev.* 11, 2494-509.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. und Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-4.
- Barges, S., Mihaly, J., Galloni, M., Hagstrom, K., Muller, M., Shanower, G., Schedl, P., Gyurkovics, H. und Karch, F. (2000). The *Fab-8* boundary defines the distal limit of the bithorax complex *iab-7* domain and insulates *iab-7* from initiation elements and a PRE in the adjacent *iab-8* domain. *Development* 127, 779-90.
- Beachy, P. A., Helfand, S. und Hogness, D. S. (1985). Segmental distribution of bithorax complex proteins during *Drosophila* development. *Nature* 313, 545-551.
- Bejsovec, A. und Martinez Arias, A. (1991). Roles of *wingless* in patterning the larval epidermis of *Drosophila*. *Development* 113, 471-85.
- Bell, A. C. und Felsenfeld, G. (1999). Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 191-8.
- Boulet, A. M., Lloyd, A. und Sakonju, S. (1991). Molecular definition of the morphogenetic and regulatory functions and the *cis*-regulatory elements of the *Drosophila Abd-B* homeotic gene. *Development* 111, 393-405.
- Brand, A. H., Manoukian, A. S. und Perrimon, N. (1994). Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol.* 44, 635-654.
- Breiling, A. (1998) Charakterisierung der funktionellen Aufgaben der beiden evolutionär konservierten Bereiche des *Polycomb*-Proteins aus *D. melanogaster*: Die Chromodomäne und der C-Terminus. Dissertation Universität Heidelberg, Heidelberg.
- Breiling, A., Bonte, E., Ferrari, S., Becker, P. B. und Paro, R. (1999). The *Drosophila* Polycomb protein interacts with nucleosomal core particles *In vitro* via its repression domain. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8451-60.
- Breiling, A., Turner, B. M., Bianchi, M. E. und Orlando, V. (2001). General transcription factors bind promoters repressed by *Polycomb* group proteins. *Nature* 412, 651-5.
- Brower, D. L. (1987). *Ultrabithorax* gene expression in *Drosophila* imaginal discs and larval nervous system. *Development* 101, 83-92.

- Brown, C. E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S. C., Carrozza, M. J., Tan, S. und Workman, J. L. (2001). Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science* 292, 2333-7.
- Brown, C. E., Lechner, T., Howe, L. und Workman, J. L. (2000). The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem. Sci.* 25, 15-9.
- Bungert, J., Dave, U., Lim, K. C., Lieuw, K. H., Shavit, J. A., Liu, Q. und Engel, J. D. (1995). Synergistic regulation of human *beta-globin* gene switching by locus control region elements HS3 and HS4. *Genes Dev.* 9, 3083-96.
- Busturia, A. und Bienz, M. (1993). Silencers in *Abdominal-B*, a homeotic *Drosophila* gene. *EMBO J.* 12, 1415-1425.
- Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V. (1985). The embryonic development of *Drosophila melanogaster* (Berlin: Springer-Verlag).
- Casanova, J., Sánchez-Herrero, E. und Morata, G. (1986). Identification and characterisation of a parasegment specific regulatory element of the *Abdominal-B* gene of *Drosophila*. *Cell* 47, 627-636.
- Castelli-Gair, J., Greig, S., Micklem, G. und Akam, M. (1994). Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function. *Development* 120, 1983-95.
- Cavalli, G., Orlando, V. und Paro, R. (1998). Mapping DNA target sites of chromatin-associated proteins by formaldehyde cross-linking in *Drosophila* embryos. In *Chromosome structural analysis: a practical approach*, W. A. Bickmore, ed. (Oxford, UK: Oxford University Press).
- Cavalli, G. und Paro, R. (1998). The *Drosophila Fab-7* chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell* 93, 505-18.
- Cavalli, G. und Paro, R. (1999). Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator. *Science* 286, 955-8.
- Celniker, S. E., Keelan, D. J. und Lewis, E. B. (1989). The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the *Abdominal-B* domain. *Genes Dev.* 3, 1424-1436.
- Celniker, S. E. und Lewis, E. B. (1987). *Transabdominal*, a dominant mutant of the Bithorax Complex, produces a sexually dimorphic segmental transformation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1, 111-23.
- Chan, C. S., Rastelli, L. und Pirrotta, V. (1994). A *Polycomb* response element in the *Ubx* gene that determines an epigenetically inherited state of repression. *EMBO J.* 13, 2553-64.
- Chang, Y.-L., King, B. O., O'Connor, M., Mazo, A. und Huang, D.-H. (1995). Functional reconstruction of *trans* regulation of the Ultrabithorax promoter by the products of two antagonistic genes, *Trithorax* and *Polycomb*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6601-6612.
- Chen, S. und Corces, V. G. (2001). The *gypsy* insulator of *Drosophila* affects chromatin structure in a directional manner. *Genetics* 159, 1649-58.
- Chen, S., West, R. W., Ma, J. L., Johnson, S. L., Gans, H. und Woldehawariat, G. (1993). TSF1 to TSF6, Required for Silencing the *Saccharomyces cerevisiae* GAL Genes, Are Global Regulatory Genes. *Genetics* 134, 701-716.
- Cheung, P., Allis, C. D. und Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263-71.
- Chinwalla, V., Jane, E. P. und Harte, P. J. (1995). The *Drosophila* Trithorax protein binds to specific chromosomal sites and is co-localized with Polycomb at many sites. *EMBO J.* 14, 2056-2065.

- Clayton, A. L., Rose, S., Barratt, M. J. und Mahadevan, L. C. (2000). Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *EMBO J.* 19, 3714-26.
- Crosby, M. A., Lundquist, E. A., Tautvydas, R. M. und Johnson, J. J. (1993). The 3' regulatory region of the *Abdominal-B* gene: genetic analysis supports a model of reiterated and interchangeable regulatory elements. *Genetics* 134, 809-24.
- Cumberledge, Z. und Sakonju, S. (1990). Characterization of two RNAs transcribed from the *cis*-regulatory region of the *abd-A* domain within the *Drosophila* bithorax complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3259-63.
- Czermin, B., Schotta, G., Hulsmann, B. B., Brehm, A., Becker, P. B., Reuter, G. und Imhof, A. (2001). Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep.* 2, 915-9.
- Deckert, J. und Struhl, K. (2001). Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2726-35.
- Duboule, D. und Dolle, P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J.* 8, 1497-505.
- Duboule, D. und Morata, G. (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet.* 10, 358-64.
- Duncan, I. M. (1982). *Polycomblike*: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 102, 49-70.
- Dura, J.-M., Randsholt, N. B., Deatrick, J., Erk, I., Santamaria, P., Freeman, J. D., Freeman, S. J., Weddell, D. und Brock, H. W. (1987). A complex genetic locus, *polyhomeotic*, is required for segmental specification and epidermal development in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 51, 829-839.
- Eberhardter, A. und Becker, P. B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin: Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* 3, 224-9.
- Elfring, L. K., Daniel, C., Papoulas, O., Deuring, R., Sarte, M., Moseley, S., Beek, S. J., Waldrip, W. R., Daubresse, G., DePace, A., Kennison, J. A. und Tamkun, J. W. (1998). Genetic analysis of *brahma*: the *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* 148, 251-65.
- Eissenberg, J. C., Morris, G. D., Reuter, G. und Hartnett, T. (1992). The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics* 131, 345-52.
- Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D. I., Enver, T., Ley, T. J. und Groudine, M. (1995). Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the *beta-globin* locus. *Genes Dev.* 9, 2203-13.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11.
- Fletcher, T. M. und Hansen, J. C. (1996). The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Expr.* 6, 149-88.
- Flint, S. J. und Weintraub, H. M. (1977). An altered subunit configuration associated with the actively transcribed DNA of integrated adenovirus genes. *Cell* 12, 783-94.
- Forrester, W. C., Thompson, C., Elder, J. T. und Groudine, M. (1986). A developmentally stable chromatin structure in the *human* β -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1359-63.
- Forsberg, E. C. und Bresnick, E. H. (2001). Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world. *Bioessays* 23, 820-30.
- Francis, N. J. und Kingston, R. E. (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 409-21.

- Franke, A., DeCamillis, M., Zink, D., Cheng, N., Brock, H. W. und Paro, R. (1992). Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* 11, 2941-50.
- Galloni, M., Gyurkovics, H., Schedl, P. und Karch, F. (1993). The bluetail transposon: evidence for independent *cis*-regulatory domains and domain boundaries in the bithorax complex. *EMBO J.* 12, 1087-1097.
- Gaunt, S. J., Krumlauf, R. und Duboule, D. (1989). Mouse homeo-genes within a subfamily, *Hox-1.4*, -2.6 and -5.1, display similar anteroposterior domains of expression in the embryo, but show stage- and tissue-dependent differences in their regulation. *Development* 107, 131-41.
- Gehring, W. J., Muller, M., Affolter, M., Percival-Smith, A., Billeter, M., Qian, Y. Q., Otting, G. und Wuthrich, K. (1990). The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends Genet.* 6, 323-9.
- Giniger, E., Varnum, S. M. und Ptashne, M. (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40, 767-774.
- Graham, A., Papalopulu, N. und Krumlauf, R. (1989). The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common feature of organization and expression. *Cell* 57, 367-378.
- Granok, H., Leibovitch, B. A., Shaffer, C. D. und Elgin, S. C. R. (1995). Ga-ga over GAGA factor. *Curr. Biol.* 5, 238-241.
- Grewal, S. I. S. und Klar, A. J. S. (1996). Chromosomal inheritance of epigenetic states in fission yeast during mitosis and meiosis. *Cell* 86, 95-101.
- Gribnau, J., Diderich, K., Pruzina, S., Calzolari, R. und Fraser, P. (2000). Intergenic transcription and developmental remodeling of chromatin subdomains in the human β -globin locus. *Mol. Cell* 5, 377-86.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-52.
- Gunster, M. J., Satijn, D. P. E., Hamer, K. M., Denblauwen, J. L., Debruijn, D., Alkema, M. J., Vanlohuizen, M., Vandriel, R. und Otte, A. P. (1997). Identification and characterization of interactions between the vertebrate Polycomb-group protein BMI1 and human homologs of polyhomeotic. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2326-2335.
- Gyurkovics, H., Gausz, J., Kummer, J. und Karch, F. (1990). A new homeotic mutation in the *Drosophila* bithorax complex removes a boundary separating two domains of regulation. *EMBO J.* 9, 2579-2585.
- Hagstrom, K., Muller, M. und Schedl, P. (1997). A *Polycomb* and GAGA dependent silencer adjoins the *Fab-7* boundary in the *Drosophila* bithorax complex. *Genetics* 146, 1365-1380.
- Hagstrom, K., Müller, M. und Schedl, P. (1996). *Fab-7* functions as a chromatin domain boundary to ensure proper segment specification by the *Drosophila* bithorax complex. *Genes Dev.* 10, 3202-3215.
- Hayashi, S. und Scott, M. P. (1990). What determines the specificity of action of *Drosophila* homeodomain proteins? *Cell* 63, 883-94.
- Hebbes, T. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W. und Crane-Robinson, C. (1994). Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken *beta-globin* chromosomal domain. *EMBO J.* 13, 1823-30.
- Hemenway, C. S., Halligan, B. W. und Levy, L. S. (1998). The Bmi-1 oncoprotein interacts with dinG and MPH2: the role of RING finger domains. *Oncogene* 16, 2541-7.
- Hobert, O., Sures, I., Ciossek, T., Fuchs, M. und Ullrich, A. (1996). Isolation and developmental expression analysis of *Enx-1*, a novel mouse Polycomb group gene. *Mech. Dev.* 55, 171-84.
- Hogness, D. S., Lipshitz, H. D., Beachy, P. A., Peattie, D. A., Saint, R. B., Goldschmidt-Clermont, M., Harte, P. J., Gavis, E. R. und Helfand, S. L. (1985). Regulation and products of the *Ubx* domain of the bithorax complex. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 50, 181-94.

- Hopmann, R., Duncan, D. und Duncan, I. (1995). Transvection in the *iab-5,6,7* region of the bithorax complex of *Drosophila*: homology dependent interactions in *trans*. *Genetics* 139, 815-833.
- Howe, L., Brown, C. E., Lechner, T. und Workman, J. L. (1999). Histone acetyltransferase complexes and their link to transcription. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Expr.* 9, 231-43.
- Hsu, J. Y., Sun, Z. W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D. K., Grushcow, J. M., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Hunt, D. F., Lin, R., Smith, M. M. und Allis, C. D. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102, 279-91.
- Hug, B. A., Wesselschmidt, R. L., Fiering, S., Bender, M. A., Epner, E., Groudine, M. und Ley, T. J. (1996). Analysis of mice containing a targeted deletion of beta-globin locus control region 5' hypersensitive site 3. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2906-12.
- Ingham, P. W. (1998). *trithorax* and the regulation of homeotic gene expression in *Drosophila*: a historical perspective. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 423-9.
- Izpisua-Belmonte, J. C., Falkenstein, H., Dolle, P., Renucci, A. und Duboule, D. (1991). Murine genes related to the *Drosophila Abd-B* homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J.* 10, 2279-89.
- Jenuwein, T. und Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-80.
- Johnston, M. (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 51, 458-476.
- Jones, R. S. und Gelbart, W. M. (1993). The *Drosophila* Polycomb-group gene *Enhancer of zeste* contains a region with sequence similarity to *trithorax*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6357-6366.
- Jürgens, G. (1985). A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* 316, 153-155.
- Karch, F., Bender, W. und Weiffenbach, B. (1990). *abdA* expression in *Drosophila* embryos. *Genes Dev.*, 1573-1587.
- Karch, F., Galloni, M., Sipos, L., Gausz, J., Gyurkovics, H. und Schedl, P. (1994). *Mcp* and *Fab-7*: molecular analysis of putative boundaries of *cis*-regulatory domains in the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 22, 3138-46.
- Karch, F., Weiffenbach, B., Peifer, M., Bender, W., Duncan, I., Celniker, S., Crosbi, M. und Lewis, E. B. (1985). The *abdominal* region of the bithorax complex. *Cell* 43, 81-96.
- Kaufman, T., Seager, M. A. und Olsen, G. (1990). The molecular and genetic organisation of the of the *Antennapedia* complex of *Drosophila melanogaster*. In *Advances in Genetics*, T. R. F. Wright und J. G. Scandalios, eds. (San Diego: Academic press), S. 309-362.
- Kennerdell, J. R. und Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the *wingless* pathway. *Cell* 95, 1017-26.
- Kennison, J. A. (1995). The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: *trans*-regulators of homeotic gene function. *Annu. Rev. Genet.* 29, 289-303.
- Kingston, R. E., Bunker, C. A. und Imbalzano, A. N. (1996). Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev.* 10, 905-20.
- Kingston, R. E., Bunker, C. A. und Imbalzano, A. N. (1996). Repression and activation by protein multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev.* 10, 905-920.
- Kingston, R. E. und Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13, 2339-52.

- Kondo, T., Zakany, J. und Duboule, D. (1998). Control of colinearity in *Abd-B* genes of the mouse HoxD complex. *Mol. Cell* 1, 289-300.
- Kong, S., Bohl, D., Li, C. und Tuan, D. (1997). Transcription of the HS2 enhancer toward a *cis*-linked gene is independent of the orientation, position, and distance of the enhancer relative to the gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3955-65.
- Kornberg, R. D. und Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285-94.
- Krajewski, W. A. und Becker, P. B. (1998). Reconstitution of hyperacetylated, DNase I-sensitive chromatin characterized by high conformational flexibility of nucleosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1540-5.
- Krumlauf, R. (1994). *Hox* genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.
- Kouzarides, T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19, 1176-9.
- Kuziora, M. A. und McGinnis, W. (1988). Autoregulation of a *Drosophila* homeotic selector gene. *Cell* 55, 477-485.
- Kyba, M. und Brock, H. W. (1998). The *Drosophila* Polycomb group protein Psc contacts ph and Pc through specific conserved domains. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2712-20.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. und Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-20.
- Laible, G., Wolf, A., Dorn, R., Reuter, G., Nislow, C., Lebersorger, A., Popkin, D., Pillus, L. und Jenuwein, T. (1997). Mammalian homologues of the Polycomb-group gene *Enhancer of zeste* mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *EMBO J.* 16, 3219-3232.
- Lamka, M. L., Boulet, A. M. und Sakonju, S. (1992). Ectopic expression of UBX and ABD-B proteins during *Drosophila* embryogenesis: competition, not a functional hierarchy, explains phenotypic suppression. *Development* 116, 841-854.
- Lawrence, P. A. und Morata, G. (1994). Homeobox genes: their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* 78, 181-9.
- Levine, M. und Hoey, T. (1988). Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* 55, 537-40.
- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-70.
- Li, J., Lin, Q., Wang, W., Wade, P. und Wong, J. (2002). Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. *Genes Dev.* 16, 687-92.
- Li, W., Boswell, R. und Wood, W. B. (2000). *mag-1*, a homolog of *Drosophila mago nashi*, regulates hermaphrodite germ-line sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 218, 172-82.
- Lindsley, D. L. und Zimm, G. G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster* (London: Academic Press).
- Lipshitz, P., Hogness (1987). Novel transcripts from the *Ultrabithorax* domain of the bithorax complex. *Genes Dev.* 1, 307-22.
- Litt, M. D., Simpson, M., Recillas-Targa, F., Prioleau, M. N. und Felsenfeld, G. (2001). Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *EMBO J.* 20, 2224-35.
- Lonie, A., Dandrea, R., Paro, R. und Saint, R. (1994). Molecular characterisation of the *Polycomblake* gene of *Drosophila melanogaster*, a *trans*-acting negative regulator of homeotic gene expression. *Development* 120, 2629-2636.
- Lupo, R., Breiling, A., Bianchi, M. E. und Orlando, V. (2001). *Drosophila* chromosome condensation proteins

- Topoisomerase II and Barren colocalize with Polycomb and maintain *Fab-7* PRE silencing. *Mol. Cell* 7, 127-36.
- Lyko, F., Brenton, J. D., Surani, M. A. und Paro, R. (1997). An imprinting element from the mouse H19 locus functions as a silencer in *Drosophila*. *Nat. Genet.* 16, 171-173.
- Lyko, F., Ramsahoye, B. H. und Jaenisch, R. (2000). DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408, 538-40.
- Macias, A., Casanova, J. und Morata, G. (1990). Expression and regulation of the *abd-A* gene of *Drosophila*. *Development* 110, 1197-1207.
- Martin, C. H., Mayeda, C. A., Davis, C. A., Ericsson, C. L., Knafels, J. D., Mathog, D. R., Celniker, S. E., Lewis, E. B. und Palazzolo, M. J. (1995). Complete sequence of the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8398-8402.
- Mazo, A. M., Huang, D. H., Mozer, B. A. und Dawid, I. B. (1990). The *trithorax* gene, a *trans*-acting regulator of the bithorax complex in *Drosophila*, encodes a protein with zinc-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2112-2116.
- Mihaly, J., Hogga, I., Barges, S., Galloni, M., Mishra, R. K., Hagstrom, K., Muller, M., Schedl, P., Sipos, L., Gausz, J., Gyurkovics, H. und Karch, F. (1998). Chromatin domain boundaries in the Bithorax complex. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 60-70.
- Mihaly, J., Hogga, I., Gausz, J., Gyurkovics, H. und Karch, F. (1997). *In situ* dissection of the *Fab-7* region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a Polycomb response element. *Development* 124, 1809-1820.
- Mishra, R. K., Mihaly, J., Barges, S., Spierer, A., Karch, F., Hagstrom, K., Schweinsberg, S. E. und Schedl, P. (2001). The *iab-7* Polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1311-8.
- Misquitta, L. und Paterson, B. M. (1999). Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1451-6.
- Montgomery, M. K. und Fire, A. (1998). Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. *Trends Genet.* 14, 255-8.
- Möhrle, A. (1994) Das Polycomb-Protein: Charakterisierung seiner RNA-Bindeeigenschaften und seiner gebundenen RNA. Dissertation Universität Heidelberg, Heidelberg.
- Müller, J. (1995). Transcriptional silencing by the *Polycomb* protein in *Drosophila* embryos. *EMBO J.* 14, 1209-1220.
- Müller, J. und Bienz, M. (1991). Long range repression conferring boundaries of *Ultrabithorax* expression in the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 10, 3147-3155.
- Müller, J., Gaunt, S. und Lawrence, P. A. (1995). Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development* 121.
- Nomura, M., Takihara, Y. und Shimada, K. (1994). Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: one of the early inducible clones encodes a novel protein sharing several highly homologous regions with a *Drosophila* polyhomeotic protein. *Differentiation* 57, 39-50.
- Nüsslein-Volhard, C., Fröhnhofer, H. G. und Lehmann, R. (1987). Determination of Anteroposterior Polarity in *Drosophila*. *Science* 238, 1675-1681.
- O'Brien, T., Wilkins, R. C., Giardina, C. und Lis, J. T. (1995). Distribution of GAGA protein on *Drosophila* genes *in vivo*. *Genes Dev.* 9, 1098-110.
- Orlando, V., Jane, E., P., Chinwalla, V., Harte, P., J. und Paro, R. (1998). Binding of trithorax and Polycomb

proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J.* 17, 5141-5150.

Orlando, V. und Paro, R. (1993). Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using *in vivo* formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* 75, 1187-1198.

Paro, R. und Harte, P. J. (1996). The role of Polycomb group and trithorax group chromatin complexes in the maintenance of determined cell states. In *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*, V. E. A. Russo, R. A. Martienssen und A. R. Riggs, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), S. 507-528.

Paro, R. und Hogness, D. S. (1991). The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 263-267.

Pearce, J. J. H., Singh, P. B. und Gaunt, S. J. (1992). The mouse has a *Polycomb-like* chromobox gene. *Development* 114, 921-929.

Peterson, C. L. und Herskowitz, I. (1992). Characterization of the Yeast SWI1, SWI2, und SWI3 Genes, Which Encode a Global Activator of Transcription. *Cell* 68, 573-583.

Pfeifer, K., Prezant, T. und Guarente, L. (1987). Yeast HAP1 activator binds to two upstream activation sites of different sequence. *Cell* 49, 19-27.

Rastelli, L., Chan, C. S. und Pirrotta, V. (1993). Related chromosome binding sites for *zeste*, suppressors of *zeste* and Polycomb group proteins in *Drosophila* and their dependence on *Enhancer of zeste* function. *EMBO J.* 12, 1513-1522.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D. und Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-9.

Ristaldi, M. S., Drabek, D., Gribnau, J., Poddie, D., Yannoutsos, N., Cao, A., Grosveld, F. und Imam, A. M. (2001). The role of the -50 region of the human γ -globin gene in switching. *EMBO J.* 20, 5242-9.

Rubin, G. M. und Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348-53.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning - A laboratory manual*. Second edition (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sanchez-Herrero, E. (1991). Control of the expression of the bithorax complex genes *abdominal-A* and *abdominal-B* by *cis*-regulatory regions in *Drosophila* embryos. *Development* 111, 437-49.

Sanchez-Herrero, E. und Akam, M. (1989). Spatially ordered transcription of regulatory DNA in the bithorax complex of *Drosophila*. *Development* 107, 321-9.

Satijn, D. P. E., Gunster, M. J., Vandervlag, J., Hamer, K. M., Schul, W., Alkema, M. J., Saurin, A. J., Freemont, P. S., Vandriel, R. und Otte, A. P. (1997). RING1 is associated with the Polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4105-4113.

Saurin, A. J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Kingston, R. E. (2001). A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* 412, 655-60.

Schübeler, D., Groudine, M. und Bender, M. A. (2001). The murine *beta-globin* locus control region regulates the rate of transcription but not the hyperacetylation of histones at the active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11432-7.

Schumacher, A., Faust, C. und Magnuson, T. (1996). Positional cloning of a global regulator of anterior-posterior patterning in mice. *Nature* 384, 648.

Selleck, S. B. und Majors, J. E. (1987). *In vivo* DNA-binding properties of a yeast transcription activator protein. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3260-3267.

- Sewalt, R. G., van der Vlag, J., Gunster, M. J., Hamer, K. M., den Blaauwen, J. L., Satijn, D. P., Hendrix, T., van Driel, R. und Otte, A. P. (1998). Characterization of interactions between the mammalian Polycomb-group proteins Enx1/EZH2 and EED suggests the existence of different mammalian Polycomb-group protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3586-95.
- Shearn, A. (1989). The *ash-1*, *ash-2* and *trithorax* genes of *Drosophila melanogaster* are functionally related. *Genetics* 121, 517-25.
- Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A. und Wu, C. (2000). A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 406, 541-4.
- Simon, J., Chiang, A. und Bender, W. (1992). Ten different *Polycomb* group genes are required for spatial control of *abd-A* and *Abd-B* homeotic products. *Development* 114, 493-505.
- Simon, J., Chiang, A., Bender, W., Shimell, M. J. und O'Connor, M. (1993). Elements of the *Drosophila* bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products. *Dev. Biol.* 158, 131-144.
- Singh, P. B., Miller, J. R., Pearce, J., Kothary, R., Burton, R. D., Paro, R., James, T. C. und Gaunt, S. J. (1991). A sequence motif found in *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res.* 19, 789-794.
- Smith, E. R., Allis, C. D. und Lucchesi, J. C. (2001). Linking global histone acetylation to the transcription enhancement of X-chromosomal genes in *Drosophila* males. *J. Biol. Chem.* 276, 31483-6.
- Spradling, A. C. und Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341-7.
- Strutt, H., Cavalli, G. und Paro, R. (1997). Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. *EMBO J.* 16, 3621-32.
- Strutt, H. und Paro, R. (1997). The Polycomb group protein complex of *Drosophila melanogaster* has different compositions at different target genes. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6773-83.
- Sudarsanam, P., Cao, Y., Wu, L., Laurent, B. C. und Winston, F. (1999). The nucleosome remodeling complex, Snf/Swi, is required for the maintenance of transcription *in vivo* and is partially redundant with the histone acetyltransferase, Gcn5. *EMBO J.* 18, 3101-6.
- Takahara, Y., Tomotsune, D., Shirai, M., Katoh-Fukui, Y., Nishii, K., Motaleb, M. A., Nomura, M., Tsuchiya, R., Fujita, Y., Shibata, Y., Higashinakagawa, T. und Shimada, K. (1997). Targeted disruption of the mouse homologue of the *Drosophila polyhomeotic* gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects. *Development* 124, 3673-82.
- Tamkun, J. W., Deuring, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Pattatucci, A. M., Kaufman, T. C. und Kennison, J. A. (1992). *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68, 561-572.
- Tillib, S., Petruk, S., Sedkov, Y., Kuzin, A., Fujioka, M., Goto, T. und Mazo, A. (1999). Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5189-202.
- Travers, A. (1999). Chromatin modification by DNA tracking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13634-7.
- Travers, A. A. (1994). Chromatin structure and dynamics. *Bioessays* 16, 657-662.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. und Reuter, G. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.* 13, 3822-3831.
- Tsukiyama, T. und Wu, C. (1997). Chromatin remodeling and transcription. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 7, 182-191.

- Tuan, D., Solomon, W., Li, Q. und London, I. M. (1985). The " β -like-globin" gene domain in human erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6384-8.
- van der Lugt, N. M., Domen, J., Linders, K., van Roon, M., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M. und van Lohuizen, M. (1994). Posterior transformation, neurological abnormalities, und severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the *bmi-1* proto-oncogene. *Genes Dev.* 8, 757-69.
- van Lohuizen, M., Frasch, M., Wientjens, E. und Berns, A. (1991). Sequence similarity between the mammalian *bmi-1* proto-oncogene and the *Drosophila* regulatory genes *Psc* and *Su(z)2*. *Nature* 353, 353-5.
- van Lohuizen, M., Tijms, M., Voncken, J. W., Schumacher, A., Magnuson, T. und Wientjens, E. (1998). Interaction of mouse Polycomb-group (Pc-G) proteins Enx1 and Enx2 with Eed: indication for separate Pc-G complexes. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3572-9.
- Vandel, L. und Trouche, D. (2001). Physical association between the histone acetyl transferase CBP and a histone methyl transferase. *EMBO Rep.* 2, 21-6.
- Wei, W. und Brennan, M. D. (2001). The *gypsy* insulator can act as a promoter-specific transcriptional stimulator. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7714-20.
- Wilson, C. J., Ghao, D. M., Imbalzano, A. N., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E. und Young, R. A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84, 235-244.
- White, R. A. H. und Wilcox, M. (1985). Distribution of *Ultrabithorax* proteins in *Drosophila*. *EMBO J.* 4, 2035-2043.
- Wianny, F. und Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* 2, 70-5.
- Wilson, C. J., Ghao, D. M., Imbalzano, A. N., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E. und Young, R. A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84, 235-244.
- Wittschieben, B. O., Otero, G., de Bizemont, T., Fellows, J., Erdjument-Bromage, H., Ohba, R., Li, Y., Allis, C. D., Tempst, P. und Svejstrup, J. Q. (1999). A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell* 4, 123-8.
- Wolffe, A. P. und Matzke, M. A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286, 481-6.
- Yudkovsky, N., Logie, C., Hahn, S. und Peterson, C. L. (1999). Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev.* 13, 2369-74.
- Zavortink, M. und Sakonju, S. (1989). The morphogenetic and regulatory functions of the *Drosophila Abdominal-B* gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters. *Genes Dev.* 3, 1969-81.
- Zhang, C.-C. und Bienz, M. (1992). Segmental determination in *Drosophila* conferred by *hunchback* (*hb*), a repressor of the homeotic gene *Ultrabithorax* (*Ubx*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7511-7515.
- Zink, B. und Paro, R. (1989). *In vivo* binding pattern of a *trans*-regulator of homeotic genes in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 337, 468-471.
- Zink, D. und Paro, R. (1995). *Drosophila Polycomb*-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a *trans*-activator to its target DNA. *EMBO J.* 14, 5660-5671.

Abkürzungen

Genetik

ANT-C	Antennapedia-Komplex
<i>abd-A</i>	<i>abdominal-A</i>
<i>Abd-B</i>	<i>Abdominal-B</i>
<i>abx</i>	<i>anterobithorax</i>
β -Gal	β -Galaktosidase
bmi 1	Leukemia viral BMI-1 oncogene homolog
<i>brm</i>	<i>Brahma</i>
BX-C	Bithorax-Komplex
<i>bx</i>	<i>bithorax</i>
<i>bxd</i>	<i>bithoraxoid</i>
CMM	Cellular Memory Module
<i>esc</i>	<i>Extra sex combs</i>
<i>E(var)</i>	<i>Enhancer of position effect variegation</i>
<i>E(z)</i>	<i>Enhancer of zeste</i>
<i>Fab</i>	<i>Frontabdominal</i>
Gal4	Hefegen zum Wachstum auf Galaktose
<i>iab</i>	<i>infra-abdominal</i>
<i>hb</i>	<i>hunchback</i>
Hox	Homeo Box (Homöobox)
<i>HP1</i>	<i>Heterochromatin-assoziiertes Protein 1</i>
<i>hsp</i>	<i>heatshockprotein (Hitzeschockprotein)</i>
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase
LCR	Locus Control Region
M33	Maushomolog von <i>Drosophila Polycomb</i>
<i>MCP</i>	<i>Miscadestral pigmentation</i>
Mel	Oncogene mel
<i>mor</i>	<i>moira</i>
<i>pbx</i>	<i>posterobithorax</i>
<i>Pc</i>	<i>Polycomb</i>
<i>PcG</i>	<i>Polycomb-Gruppe</i>
<i>Pcl</i>	<i>Polycomb-like</i>
PEV	Positions-Effekt-Variegation
<i>pho</i>	<i>pleiohomeotic</i>
PRC1	Polycomb Repressive Complex 1
PRE	Polycomb Response Element
<i>Ph</i>	<i>Polyhomeotic</i>
<i>Pho</i>	<i>Pleiohomeotic</i>
<i>Psc</i>	<i>Posterior sex combs</i>
rae28	Maushomolog von <i>Drosophila polyhomeotic</i>
<i>Su(var)</i>	<i>Suppressor of variegation</i>
<i>Su(z)</i>	<i>Suppressor of zeste</i>
SWI/SNF	ausgesprochen als „Switch/Sniff“ (SNF = Sucrose non fermentor)
<i>Trl</i>	<i>Trithorax-like</i>
<i>trx</i>	<i>trithorax</i>
trxG	trithorax-Gruppe

<i>Ubx</i>	<i>Ultrabithorax</i>
<i>w</i>	<i>white</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>

Masse

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
K	1000 Umdrehungen pro Minute
k	Kilo
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Molar
MDa	Megadalton
mA	Milliampère
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
s	Sekunde
u	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumenkonzentration (Volumen pro Volumen)
W	Watt
w/v	Massenkonzentration (Masse pro Volumen)

Sonstige

A	Adenin
a	anterior
α	anti
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase

APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-Triphosphat
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C	Cytosin
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
DIG	Digoxigenin
d.h.	das heisst
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	Doppelstrang (double strand)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
evtl.	eventuell
G	Guanin
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
H ₂ O	Wasser
HS	Hitzeschock
LB	Luria-Bertani-Medium
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster
p	posterior
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered salin“)
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
persönl.	persönlich
Pol II	RNA Polymerase II
PS	Parasegment
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
S.	Seite
ss	Einzelstrang (single strand)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecylsulfat“)
SL2	Schneider Line 2
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRE	Trithorax response element
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Trichostatin A
U	Uracil
UTP	Uracil-Triphosphat
UAS	„Upstream Activating Sequence“
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
Wt	Wildtyp
X-ChIP	Formaldehyde crosslinking Chromatin Immunoprecipitation

X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem